

The 2000 314
N° d'ordre :

50376.
1999 -
263

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE**

THESE DE DOCTORAT

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

présentée et soutenue publiquement par

Karine PETITPREZ

**Approche fonctionnelle et idiotypique de glycanes
du parasite *Schistosoma mansoni* chez le rat.**



Soutenue le 10 Mai 1999 devant la commission d'examen :

Président : Professeur G. Spik

Directeur de thèse : Professeur A. Capron

Rapporteurs : Docteur J.C. Cailliez
Docteur C. Verwaerde

Examineurs : Docteur J.M. Grzych
Docteur J. Khalife

Ce travail de thèse a été réalisé

**Au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
INSERM U167
à l'Institut Pasteur de Lille**

**sous la direction du Professeur A. Capron
dans les groupes de recherche respectivement animés par le Docteur J.M. Grzych
et le Docteur J. Khalife**

**Ces travaux ont été co-financés par l'Institut Pasteur de Lille et
le Conseil Régional Nord / Pas-de-Calais**

A mes parents,

*A Tristan,
pour le bonheur d'être Maman avant d'être Docteur*

A Monsieur le Professeur A. Capron,

Pour m'avoir accueillie chaleureusement dans votre laboratoire, soutenue et encouragée dans l'évolution de ce travail, et surtout pour avoir répondu à mes sollicitations au cours de ces années de thèse.

A Monique Capron,

Pour votre dynamisme, votre motivation scientifique si communicative, votre disponibilité et votre efficacité.

A Madame le Professeur G. Spik qui m'a fait l'honneur de présider cette thèse.

A Madame le Docteur C. Verwaerde,

Pour avoir accepté avec beaucoup de gentillesse d'apporter un regard critique sur ce travail, et pour toutes ces considérations sur ce que représente le « travail de thèse ».

A Monsieur le Docteur J.C. Cailliez,

Pour avoir accepté très spontanément d'être rapporteur de ce travail, malgré un emploi du temps si complexe.

A Monsieur le Docteur J. Khalife,

Pour m'avoir laissé une place au sein de ton équipe et de m'avoir permis de développer un aspect original dans ce travail.

A Monsieur le Docteur J.M. Grzych,

Pour m'avoir accueillie dans ton laboratoire, et pour avoir toujours cru dans certains aspects de ce travail à ma place. Merci pour ma liberté d'action et pour ta disponibilité.

A Monsieur le Professeur J. Montreuil et au Docteur M. Nita-Lazar qui nous ont fourni le matériel glucidique dont nous avons besoin.

Parce que ces années de thèse resteront un moment fort de ma vie, je dédie cette thèse à...

Vinca, ma Vinca : on s'est accompagné dans nos galères, mais aussi lors de bons moments, oh combien sportifs, ou encore parmi les fraises... En tant qu'immunologiste, je proposerai tes éclats de rire comme vaccin universel! Et puis t'avoir comme amie, c'est "comme les îles au soleil", "les 2 doigts dans la prise", "trop précieux", "savoir aimer"...

Ursula, depuis nos premiers exams de DEA jusqu'aux dernières pages de ce manuscrit, tu m'as toujours soutenue et encouragée. Merci d'être aussi cette Maman là, et de me faire une place auprès de ce p'tit bout d'amour qu'est Yeelena.

Ma petite Sa, toi si pratique et constructive, si diplomate, tu m'auras toujours été de bons conseils. Merci de ta spontanéité d'être, de m'avoir appris à "poser mes médailles", et à apprécier ces petits riens de la vie de tous les jours.

Mònica, même si Ziggy me sortait par les oreilles, désormais "Starmania" a pris pour moi les couleurs du Portugal... Merci de ta compréhension, de ta convivialité et de ton humour.

Pascal, te remercier ? Les 200 pages de cette thèse n'en suffiraient pas! Merci pour ce que tu es, pour tout ce que tu as fait, même si souvent c'était trop. Pour toutes ces affinités partagées: murder, houblon, canards, théâtre, folk, fées et farfadets, légendes et chevaliers.....j'en passe, la barre est haute ! Aussi, à moi de te conter une histoire : "Il était une fois dans un pays lointain, peut-être bien en bord de mer, un lapin....sûrement parenté avec celui d'Alice puisque le temps qui s'écoulait lui importait beaucoup. Perdu par une nuit très noire, son ami lutin lui apprit à trouver son chemin dans les étoiles...", mais l'histoire retourne dans son sac à ce moment là, car les auteurs ne précisent pas où ce chemin menait.

Sophia, merci de m'avoir transmis ton savoir-faire en culture cellulaire, et puis merci pour tout ce que renferme cette pièce de culture: tes conseils, ton attention, tes expériences partagées de femme et de mère.

Josette, tu sais que tu es un pilier.....de bonne humeur! de rigueur aussi dans le travail. Merci d'avoir pris le relai, toujours en chantonnant, quand je ne savais plus mon prénom, tard le soir, après toutes ces manip.

Jean-Loup, merci de ta grande participation à l'élaboration de ce manuscrit, de mon initiation aux joies de l'informatique, de ton perfectionnisme, de ton efficacité, et puis aussi pour toutes ces discussions loin de tout matérialisme, qui n'avaient de richesse que celle des voyages, ou de la musique.

Frédéric, c'est peut-être bien ce côté Sagittaire qui nous rapproche, alors merci d'avoir partagé cette "Folle Allure" depuis le Gabon, jusqu'à mon arrivée à Paris.

Katia, parce que toutes ces heures d'enseignement, entre étudiants et embryons, n'auraient pas été les mêmes... et je tiens tout particulièrement à te remercier pour ton attention portée à ce manuscrit.

Christine, tu m'auras toujours été de bons conseils. Merci de m'avoir accompagnée dans les bons comme dans les mauvais moments.

Catherine, tu m'as beaucoup guidée dans mes premiers pas en biologie moléculaire. Merci de ton efficacité, de ta gentillesse et de tes révoltes que je partage.

Cécile, petite Chichon, jamais ronchon...Merci de ta disponibilité.

Claude, merci pour tes services et tes bonbons. A notre concours de bidon.

Bertrand, ch'grand Quinquin du Nord, "Mr Baculovirus" ou Mr Bricolage. Merci de ton expérience et de tes blagues, grivoises de préférence!

Anne-Carott', merci pour toutes ces cellules préparées.

Sylvie, merci de ton attention à mon égard en DEA, et depuis pour tous ces week-end apaisant l'esprit, où le temps s'arrêtait parmi les oiseaux.

Ricardo, non je n'ai jamais fait partie d'aucune secte que ce soit, c'est juste que "je cultivais mon jardin"...Merci de ton amitié.

Elisabeth, merci d'avoir partagé ton expérience de "p'tite mère".

Franky, petit frère de DEA, le Sénégal te va si bien...

Loïc, merci de ta joie de vivre, ton humanisme, ton côté scout, ta cuisine.

Marina, merci de ton amitié.

A notre petit groupe de théâtre, soupape anti-stress: les Loïcs, Sophie, Catherine, Christine, Caroline, Jean-Pierre, Faouzi, Dominique; plus récemment Béatrice, Sébastien, Isabelle, Brigitte (pour son efficacité professionnelle aussi), Yann et surtout Pierre-Yves pour l'esprit qu'il a su y instaurer et sa philosophie.

François, j'espère toujours le "Nature" promis de nos manips communes... Merci de m'avoir accordé du temps.

Gaëtane, à notre passion commune pour la Bretagne et les chats.

Sabine, binôme depuis l'IUT, à nos considérations existentialistes sur la recherche.

Farida, amitié récente, merci de ton aide dans ces derniers jours chargés.

A tous ces "pigeons-voyageurs-chercheurs", parfois retournés dans leur nid, éparpillés de par le monde: Tobias, Rodolpho, Esteban, Hector, Nathalie, Marie-Stéphanie...

A celles qui partagent un quotidien dont les services sont si précieux : Chantal, Maria, Nicole et Myriam, Patricia et Danièle, Suzanne...

A ceux et celles que je ne voudrais pas oublier: Jean-François, Kader, Estelle, Sophie...

Mélanie, merci d'avoir corrigé mon anglais si technique et si peu littéraire.

J'oubliais... à cet inconnu (trop connu), croisé un 11 Novembre dans le brouillard de Covent Garden...

A Nancy et sa passion pour son métier, Cédric, ainsi qu'à "mes" sages-femmes aux petits soins quand j'avais du mal à faire passer la thèse au second plan: Nathalie, Véronique, Brigitte, et celle aux aiguilles magiques.

A Laurent, merci pour ta patience face à ce sale caractère, disons-le, ta curiosité des Sciences du Vivant, tes encouragements, l'amour que tu me portes...

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications et communications suivantes:

PUBLICATIONS

Karine PETITPREZ, Jean-Marie-GRZYCH, Christine PIERROT, Claude GODIN, André CAPRON and Jamal KHALIFE. Molecular cloning and expression of an anti-idiotypic antibody mimicking a protective oligosaccharide of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* (1998) 84: 38-40.

Karine PETITPREZ, Jamal KHALIFE, Catherine CETRE, Josette FONTAINE, Sophia LAFITTE, Andre CAPRON and Jean-Marie GRZYCH. Characterization of cytokines involved in the induction of a mucosal IgA response in the rat. *Scand J Immunol* (1999) Issue 1: 14-20.

COMMUNICATIONS

K. Petitprez, J.M. Grzych, C. Pierrot, A. Capron and J. Khalife. "Molecular cloning and expression of an anti-idiotypic antibody mimicking a protective oligosaccharide of the parasite *Schistosoma mansoni*". 2^e journée jeunes chercheurs, Lille, France. Novembre, 1996.

K. Petitprez, J.M. Grzych, C. Pierrot, A. Capron and J. Khalife. "Molecular cloning and expression of an anti-idiotypic antibody mimicking a protective oligosaccharide of the parasite *Schistosoma mansoni*". Colloque Lille-ULB, Bruxelles, Belgique. Janvier, 1997.

K. Petitprez. Séminaire interne, Institut Pasteur de Lille, France. Septembre, 1997.

J.M. Grzych, J. Fontaine, S. Gaubert, S. Lafitte, J. Liu, J.L. Neyrinck, K. Petitprez, M. Viana Da Costa. "Approche des propriétés effectrices des IgA dans les schistosomoses humaines et animales". Colloque Lille-ULB, Villeneuve d'Ascq, France. Mai, 1995.

S. Gaubert, K. Petitprez, J.M. Grzych, G. Riveau, A. Capron and M. Capron. "Th2 Response and protection against Helminths". Xe séminaire fondamental de microbiologie clinique. Noisy-le-Grand, France. Décembre, 1995.

J. Khalife, K. Petitprez, C. Godin, J.M. Grzych and A. Capron. "Cloning of anti-idiotypic antibody mimicking a protective oligosaccharide of *Schistosoma mansoni* , a novel approach for design of a glycanic vaccine". Meeting de Parasitologie Moléculaire, Laboratoire de Biologie Marine, Woods Hole, Etats-Unis. Septembre, 1996.

K. Petitprez, J.M. Grzych, A. Capron and J. Khalife. "Internal image of a protective glycoprotein of *Schistosoma mansoni* ". Société Britanique de Parasitologie, Spring meeting, Manchester, Grande-Bretagne. Avril, 1997.

K. Petitprez, Jamal KHALIFE, Catherine CETRE, Josette FONTAINE, Sophia LAFITTE, André CAPRON and Jean-Marie GRZYCH. "Characterization of cytokines involved in the induction of a mucosal IgA response in the rat model." Société Française d'Immunologie, Marseille, France. Novembre, 1997.

TABLE DES MATIERES

Abréviations	14
INTRODUCTION	15
Chapitre I - La schistosomiase ou bilharziose	16
1. Généralités	17
1.1 Le parasite	
1.1.1. Place des schistosomes dans le règne animal	17
1.1.2. Cycle biologique de <i>S. mansoni</i>	18
1.2. Répartition géographique	20
1.3. Pathologies associées aux bilharzioses	22
1.4. Diagnostic	24
1.5. Lutte contre les schistosomiasés	24
1.5.1. La prophylaxie sanitaire	24
1.5.2. La lutte anti-vectorielle	25
1.5.3. La prophylaxie médicale	25
a) <i>La chimiothérapie</i>	25
b) <i>Stratégies vaccinales</i>	25
2. Réponse immunologique développée au cours d'une infection à <i>S. mansoni</i>	29
2.1. Immunité naturelle	29
2.2. Immunité acquise	30
2.2.1. Contexte cellulaire : le modèle murin	31
2.2.2. Contexte humoral : mécanismes effecteurs chez le rat et chez l'homme	33
2.3. Place particulière de la réponse IgA	34
a) <i>Réponse IgA et schistosomiase</i>	34
b) <i>Propriétés des anticorps IgA muqueux</i>	35
c) <i>Régulation de la réponse IgA par les interleukines</i>	36
2.4. Stratégies d'échappement développées par le parasite	38
2.4.1. Mimétisme moléculaire	38
2.4.2. Immunosuppression	38
2.4.3. Anticorps bloquants	39

3. Carbohydrates et schistosomes	40
3.1. Antigènes glycaniques spécifiques de stades parasitaires	40
3.1.1. Le glycocalyx	41
3.1.2. Les glycoprotéines de la membrane du ver adulte	41
3.1.3. Les antigènes circulants	42
3.1.4. Les antigènes d'œufs	42
3.2. Fonctions	45
3.2.1. Survie du parasite	45
3.2.2. Rôle des glycanes chez l'hôte vertébré	45
a) <i>Potentiel immunomodulateur du glycocalyx et des antigènes de l'œuf</i>	
b) <i>Glycanes et réaction granulomateuse</i>	47
3.2.3 Rôle des glycanes chez l'hôte intermédiaire	48
3.3. L'antigène Lewis x	48
3.3.1. Influence des anticorps anti-Le ^x	49
3.3.2. Rôle direct de l'antigène Le ^x	50
3.4. La glycoprotéine de 38 kDa	51
3.4.1. Caractérisation	51
3.4.2. Communauté antigénique avec la KLH	52
a) <i>caractérisation</i>	52
b) <i>importance de la KLH dans le diagnostic des schistosomiasés</i>	53
c) <i>KLH: effet protecteur et essais de vaccination</i>	54
 Chapitre II - Les anticorps anti-idiotypes	 56
1. Structure et diversité des immunoglobulines	57
1.1. Structures des Ig	57
1.2. Diversité des Ig	58
1.2.1. Les variations isotypiques	58
1.2.2. Les variations allotypiques	59
1.2.3. Les variations idiotypiques	59
1.3. Notion de CDR et de régions "framework"	60
2. L'idiotypie	62
2.1. Découverte de l'idiotypie	62
2.2. Bases structurales de l'expression de l'idiotypie	62
2.2.1. Méthodes sérologiques	62

2.2.2. Corrélation avec la séquence en acides aminés	63
2.3. Immunogénicité des idiotypes : induite ou spontanée	64
3. Le réseau idiotypique	66
3.1. Théorie du réseau idiotypique: hypothèse de Jerne	66
3.2. Rôle immunorégulateur du réseau idiotypique	68
3.2.1. Effet suppresseur des anti-idiotypes sur les cellules B	68
3.2.2. Activation d'une réponse immunitaire	68
3.2.3. Rôle du réseau idiotypique dans l'établissement du répertoire des cellulesB	70
4. Les anticorps anti-idiotypes: notion d'images internes	71
4.1. Hétérogénéité des anticorps anti-idiotypes	71
4.2. De la notion d'image interne au concept d'antigène de substitution	73
4.2.1. Critères définissant les Ab2 β	73
4.2.2. Bases moléculaires et structurales de l'imagerie interne	74
4.3. Applications des anticorps anti-idiotypes	77
4.3.1. Divers domaines d'applications	80
4.3.2. Image interne d'épitopes bactériens et viraux	81
4.3.3. Images internes d'épitopes parasitaires	81
4.3.4. Thérapie du cancer	82
4.3.5. Maladies auto-immunes	83
4.3.6. Applications au diagnostic	84
4.4. Limites des applications thérapeutiques des anticorps anti-idiotypes	84
5. Ingénierie des anticorps	87
5.1. Construction d'un sFv ou "single-chain Fragment variable"	87
5.2. Avantages et applications thérapeutiques des sFv	88
5.3. Cas particulier de la mimicrie d'épitopes carbohydrates	89
6. Image interne de la gp38 de <i>Schistosoma mansoni</i>	91

OBJECTIFS	93
RESULTATS	95
PARTIE I - Approche des propriétés immunomodulatrices des antigènes d'oeufs et de la glycoprotéine de 38 kDa dans l'immunité spécifique du parasite <i>S.mansoni</i> chez le rat.	96
<u>1. Induction d'une réponse IgA chez le rat par les antigènes d'oeufs de schistosome.</u>	97
1.1 Etude de la réponse humorale sérique et muqueuse	98
1.2 Etude de la réponse cellulaire	100
1.2.1 Analyse du profil de cytokines <i>in vivo</i>	100
1.2.2 Analyses préliminaires des cytokines après restimulation <i>in vitro</i>	103
1.2.3 Cellules sécrétrices	104
1.3 Etudes de fonctionnalité	105
<u>2. Etudes de l'épitope glycanique commun à la glycoprotéine de 38 kDa de <i>S.mansoni</i> et à l'hémocyanine de <i>Megathura crenulata</i> (KLH)</u>	107
2.1 Caractérisation biochimique	107
2.1.1 Préparation du matériel biologique	107
a) Fractionnement de la KLH par chromatographie d'affinité	107
b) Hydrazinolyse des glycanes de la KLH	107
2.1.2 Etude de la structure glycanique	108
a) Composition en glucides	108
b) Analyse électrophorétique	108
c) Détection des épitopes par la technique d'électrotransfert	109
2.2 Etudes immunologiques de l'épitope commun	109
2.2.1 Mesure du potentiel inhibiteur des fractions	109
2.3 Approche "par défaut" des propriétés immunomodulatrices des glycanes de la KLH	111
2.3.1 Déglycosylation de la KLH	111
2.3.2 Réponse humorale	111
2.3.3 Réponse cellulaire	113

PARTIE II - Construction d'un fragment anticorps anti-idiotypique mimant un épitope carbohydate protecteur du parasite <i>S.mansoni</i>	116
<u>1. Clonage moléculaire des régions variables</u>	118
1.1 Obtention de l'ADNc des régions variables	118
1.2 Homologies	120
1.3 Construction d'un simple fragment variable (ou sFv) recombinant	120
1.3.1 Différentes constructions	120
1.3.2 Transcription-traduction <i>in vitro</i>	123
<u>2. Expression de l'anticorps sFv recombinant</u>	123
2.1 Système bactérien	123
2.1.1 Différents vecteurs d'expression	123
2.1.2 Conservation du site de liaison à l'antigène	124
2.1.3 Immunisations	125
2.2 Cellules mammifères	128
2.3 Cellules d'insectes	128
2.3.1 Construction du virus recombinant	129
2.3.2 Détection du sFv recombinant	129
2.3.3 Immunisations	131
 MATERIEL ET METHODES	 133
 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	 146
 BIBLIOGRAPHIE	 165

ABREVIATIONS

ACF	Adjuvant Complet de Freund
AcMc	Anticorps monoclonal
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide Désoxyribonucléique génomique
AIF	Adjuvant Incomplet de Freund
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
Con-A	Concanavaline A
dNTPs	Désoxyribonucléotides
DO	Densité Optique
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FC	Furcocercaire
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IP	Intra-Péritonéale
IPTG	Isopropyl B-D Thiogalactoside
IV	Intra-Veineux
kDa	Kilo Dalton
KLH	Keyhole Limpet Haemocyanin
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
Min	Minute
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPD	Ortho-Phénylène-Diamine
PAGE	Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phényl Méthyl Sulfonide
PZQ	Praziquantel
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SC	Sous-Cutané
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEA	Soluble Egg Antigen
sFv	single Fragment variable
Sm28GST	Glutathion S-Transférase de 28 kDa de <i>S. mansoni</i>
SWAP	Soluble Worm Antigen Preparation
TGF	Tumor Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
Th	T helper
V _H	Régions variables de la chaîne lourde
V _L	Régions variables de la chaîne légère
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
X-Gal	5-bromo 4-chloro 3-indolyl β -D-galactopyranoside

INTRODUCTION

***La schistosomiase ou
bilharziose***

1. Généralités

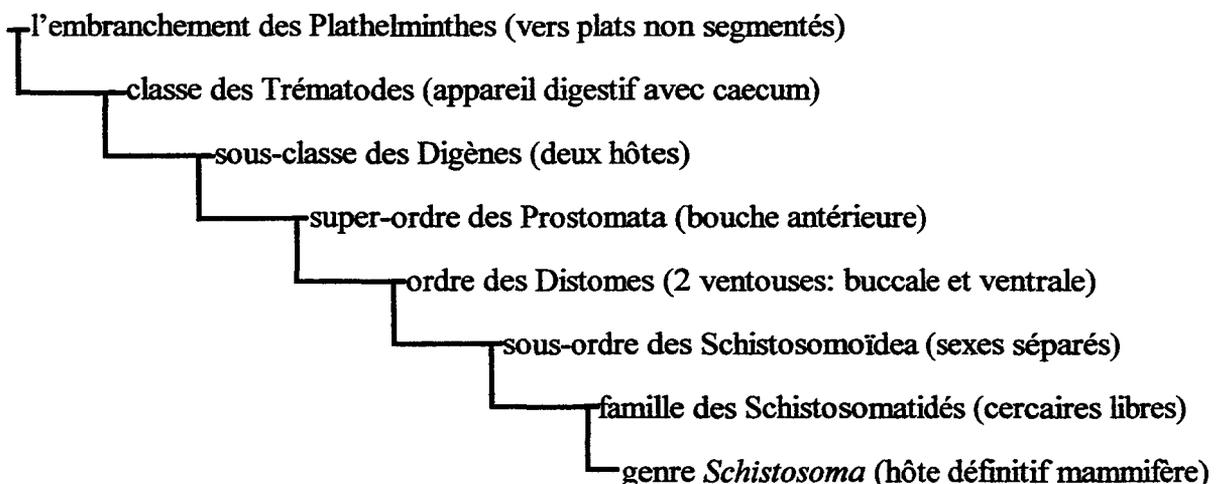
La schistosomiase est une infection parasitaire connue depuis le temps des pharaons. Elle est encore appelée bilharziose, du nom de Théodor Bilharz, un pathologiste allemand qui découvrit le premier le parasite. A l'aube du XXI^e siècle, cette maladie représente la seconde endémie parasitaire dans le monde après le paludisme, et constitue un véritable problème de santé publique dans plus de 70 pays tropicaux et sub-tropicaux. L'OMS estime en effet à 200 millions le nombre de personnes infectées et à 500 000 le nombre de décès occasionnés chaque année.

Les schistosomes, agents responsables de l'infection, sont des vers plats hémato-phages. Ils suivent un cycle évolutif passant par un hôte intermédiaire, un mollusque d'eau douce, et par un hôte définitif mammifère.

1.1. Le parasite

1.1.1. Place des schistosomes dans le règne animal

Les schistosomes se caractérisent au sein de la classification (Euzéby, 1970) par leur appartenance à :

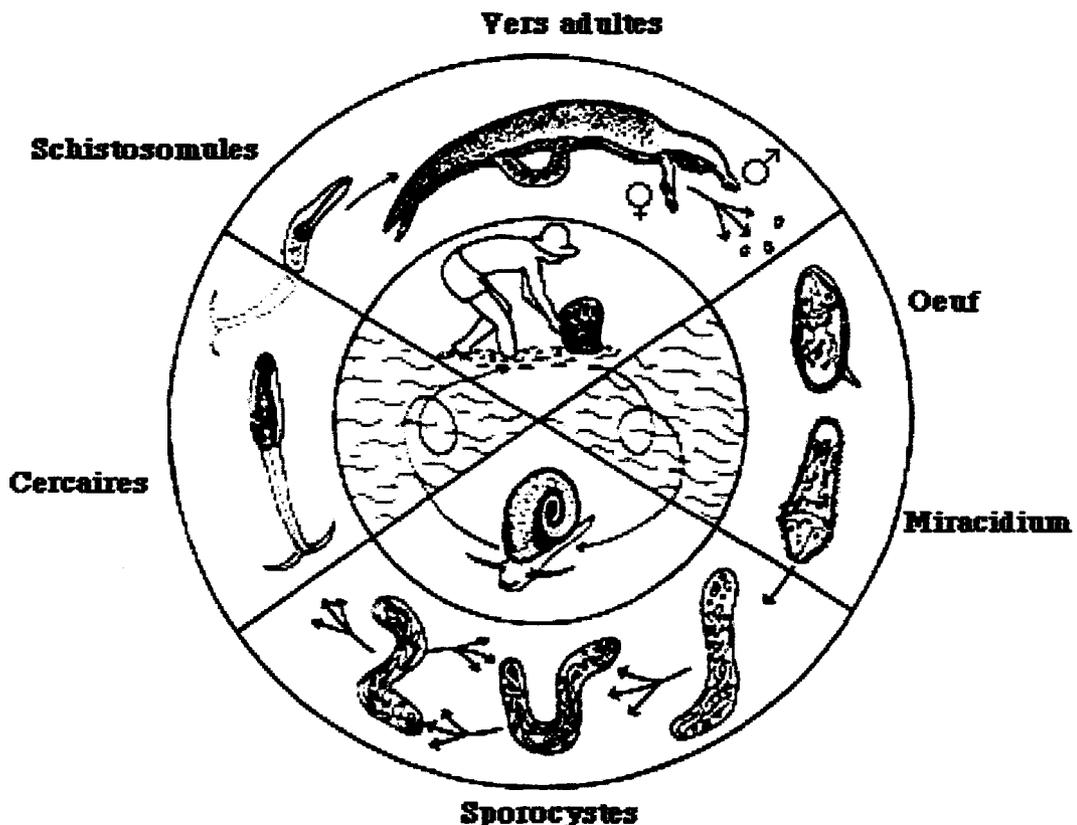


Le genre *Schistosoma* rassemble 18 espèces dont 5 parasitent l'homme (Short, 1983). La distinction entre les espèces est basée sur des critères morphologiques (tels que l'aspect des vers, des cercaires ou des œufs), biochimiques, parasitologiques (tels que la spécificité des hôtes ou le nombre d'œufs pondus par jour) ou encore pathogéniques.

La plupart des espèces respecte une spécificité d'hôte. On définit ainsi les espèces anthropophiles telles que *S. mansoni*, *S. intercalatum* (bilharzioses intestinales), *S. haematobium* (bilharziose uro-génitale), et de nombreuses espèces zoophiles telles que *S. bovis* ou *S. matthei* infectant les ruminants. Seuls *S. japonicum* et *S. mekongii* parasitent indifféremment homme et bétail. De plus, dans les biotopes communs aux deux espèces de schistosome, on peut mettre en évidence des hybrides qui sont susceptibles d'infester aussi chacun des hôtes des espèces d'origine (Kruger, 1990).

1.1.2. Cycle biologique de *S. mansoni*

Le cycle parasitaire alterne entre un hôte définitif mammifère et un hôte intermédiaire gastéropode d'eau douce.



La forme infestante du parasite, la **furcocercaire** (issue du mollusque) traverse les couches supérieures de l'épiderme de son hôte définitif en quelques minutes grâce à des mouvements vibratoires et à la sécrétion d'enzymes protéolytiques. Au cours de la pénétration, elle va perdre sa queue bifide qui lui permettait de nager en quête de son hôte ainsi que sa membrane externe formée de glycoconjugués, encore appelée glycoalyx : le parasite devient, chez l'hôte définitif, un **schistosomule**.

Rapidement passé d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie, le schistosomule modifie sa forme et l'expression de ses glycoconjugués de surface. Il quitte le derme et gagne le cœur puis les poumons, entraîné par le flux sanguin. Le stade pulmonaire du schistosomule va durer 3 à 4 jours. Par la suite, le schistosomule sera entraîné vers l'aorte, les artères mésentériques et la veine porte, jusqu'au foie, qui constituera son lieu de maturation.

Le jeune parasite va se différencier en **schistosome** et subir une maturation sexuelle. S'il est de sexe mâle, il acquiert la morphologie caractéristique du schistosome mâle : sa face ventrale forme un canal gynécophore dans lequel se loge la femelle qui atteint alors seulement sa maturité sexuelle. La longueur des vers adultes varie de 6 à 26 mm. Chez l'homme, les vers peuvent demeurer accouplés pendant plusieurs années. Les vers accouplés se déplacent ensuite à contre-courant du flux sanguin grâce à leurs deux ventouses latérales et vont gagner leur lieu de ponte. La majorité des espèces de schistosomes infectant l'homme va se nicher dans les veines proches de l'intestin. L'espèce *S. haematobium*, quant à elle, a un tropisme particulier pour le système uro-génital.

Les femelles matures vont produire des **œufs** en continu dès les 4^e-5^e semaines d'infection : la femelle de *S. mansoni* pond jusqu'à 300 œufs par jour. Les œufs de *S. mansoni* sont ensuite disséminés dans divers organes internes dont l'intestin et le foie, où ils se trouvent bloqués. Les œufs sont la cible d'une intense réaction inflammatoire désignée sous le terme de réaction granulomateuse. Ils sont ainsi responsables de la pathologie liée à l'infection. De plus, ils permettent la poursuite du cycle parasitaire. En effet, les œufs qui franchissent les muqueuses de l'appareil urinaire (*S. haematobium*) ou intestinal (*S. mansoni* et *S. japonicum*), grâce à la sécrétion de substances protéolytiques, sont excrétés dans les urines ou les selles et libérés dans l'eau.

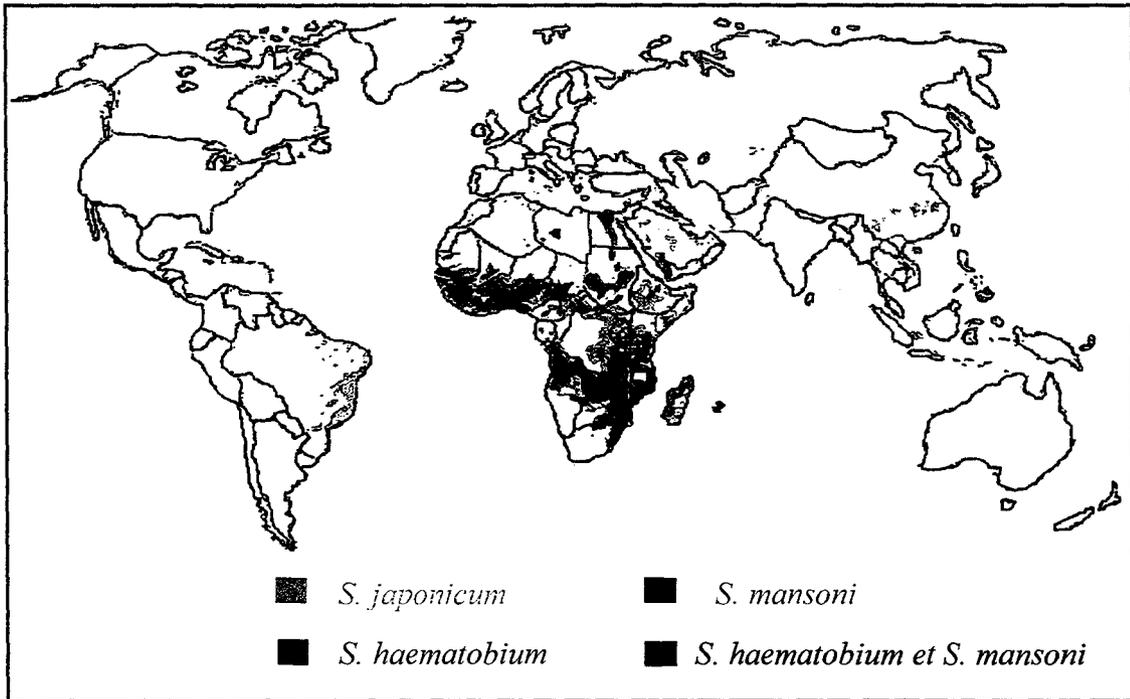
Les oeufs vont alors donner naissance, quand certaines conditions de milieu sont réunies, à une forme larvaire libre, le **miracidium**. Doté de cils vibratils, il est mobile et peut ainsi se déplacer en quête de son hôte intermédiaire, vraisemblablement attiré par des facteurs chimiotactiques. Les mollusques-hôtes sont spécifiques de chaque espèce, cette spécificité étant déterminée par des facteurs génétiques (Richards *et al.*, 1992).

A l'intérieur du mollusque, le miracidium se transforme en **sporocyste** primaire et rejoint l'hépto-pancréas de l'hôte intermédiaire. Il passe, en 3 à 8 semaines, du stade sporocyste primaire et secondaire à celui de furcocercaire par multiplication asexuée et polyembryonie. Un seul miracidium peut ainsi aboutir à la production de 100 000 cercaires. Les mollusques infestés, stimulés par la lumière et la chaleur, émettent alors chaque jour dans l'eau environnante des milliers de cercaires qui ne peuvent survivre plus de 48h en attente de l'hôte définitif.

1.2. Répartition géographique

Les schistosomiasés sont endémiques dans 76 pays sur les continents africain, américain et asiatique. Six cent millions de personnes sont exposées au risque d'infection et 200 millions sont infectées.

Chaque espèce de schistosome nécessite un hôte gastéropode spécifique, dont la répartition géographique reflète celle des différentes espèces de schistosome. Pour la plupart, les zones d'endémie suivantes présentent des conditions hydriques favorables (eau douce, température supérieure à 20°C) et simultanément des conditions d'hygiène humaine déficientes :



D'après l'OMS, février 1998 (www.who.ch)

-*S. haematobium*, agent de la bilharziose vésicale, est endémique dans 54 pays d'Afrique et de Méditerranée orientale. Il infecte environ 90 millions de personnes .

-*S. mansoni*, agent de la bilharziose intestinale, atteint 60 millions d'individus dispersés dans plus de 50 pays d'Afrique inter-tropicale, mais aussi dans le delta du Nil, le Yemen ou l'Arabie Saoudite. Il est également retrouvé aux Caraïbes et en Amérique du Sud, en particulier dans le Nord-est du Brésil, le Vénézuéla et dans quelques foyers subsistant aux Antilles.

-*S. japonicum* et *S. mekongii*, responsables de bilharzioses intestinales, sévissent en Asie. L'espèce *S. japonicum* est notamment présente en Chine, aux Philippines et en Indonésie, alors que *S. mekongii* a été identifié au Cambodge et au Laos (presqu'île du Mékong).

-*S. intercalatum*, à localisation rectale chez l'homme, est quant à lui, un parasite strictement africain. Sa présence a été détectée au Tchad, en Ouganda, au Zaïre, au Gabon et au Cameroun.

Plusieurs espèces peuvent cohabiter géographiquement : c'est le cas de *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. intercalatum*. Cette cohabitation peut donner lieu à des phénomènes d'exclusion entre les espèces en compétition pour le même hôte (Tchuem Tchuente, 1995 ; Tchuem Tchuente *et al.*, 1996), et provoquer des appariements interspécifiques qui entraînent l'apparition d'espèces hybrides (Richard-Lenoble *et al.*, 1993).

Dans certains pays, le développement socio-économique a permis une régression de l'incidence de la schistosomiase. Mais à l'inverse, dans de nombreux pays, le développement et l'utilisation de ressources hydrauliques (barrages, cultures rizicoles, réserves d'eau...) ont multiplié le nombre de biotopes aquatiques favorables à la prolifération des hôtes intermédiaires. Le flux migratoire des populations peut également modifier la répartition géographique des aires d'endémies, dont la résultante est un constant remaniement épidémiologique.

1.3. Pathologies associées aux bilharzioses

Les manifestations cliniques provoquées par les bilharzioses sont extrêmement variables, au sein d'une même population infectée. Elles sont associées à l'intensité de l'infection, à la souche du parasite infestant, à la fréquence des réinfections, au statut immunitaire de l'individu infecté ainsi qu'à des facteurs génétiques de l'hôte. Les taux les plus élevés de prévalences et d'intensité d'infection sont observées chez les enfants âgés de 5 à 15 ans, chez lesquels le nombre d'oeufs excrétés va diminuer au cours du temps (Larivière, 1993).

Dans les pays en voie de développement, d'autres maladies fréquemment associées aux schistosomiasés, telles que l'hépatite B, la salmonellose et la shigellose (pour *S. mansoni*) ou encore le cancer de la vessie (pour *S. haematobium*), viennent aggraver le tableau clinique. De manière générale, il apparaît que les modifications de la réponse immunitaire provoquée par le parasite entraînent une diminution dans l'infectivité d'autres pathogènes. Des études menées chez la souris ont par exemple pu démontrer une

augmentation de la susceptibilité des animaux infectés par *S. mansoni* vis-à-vis d'un virus recombinant exprimant la gp160 du VIH de type I (virus d'immunodéficience humaine) (Actor *et al.*, 1993 ; 1994).

La maladie s'exprime en plusieurs phases, la première phase est la **phase d'infestation** due à la pénétration des cercaires et qui se traduit par une réaction cutanée allergique encore appelée «dermite du nageur ». La deuxième phase, la **phase d'invasion**, est liée aux réactions de l'organisme au contact des antigènes et des toxines des schistosomules en développement. Elle se traduit par des manifestations allergiques souvent fébriles et une hyperéosinophilie sanguine, insuffisantes pour établir un diagnostic définitif qui nécessite une analyse sérologique complète. La **phase d'état** apparaît au minimum 2 mois après l'infestation, mais elle peut ne se manifester que beaucoup plus tard : elle correspond à l'installation des vers adultes dans leur site définitif et à la ponte des oeufs.

Les manifestations de cette dernière phase dépendent de l'espèce de schistosome mise en cause :

- *S. haematobium* entraîne des atteintes uro-génitales avec des hématuries quasi-constantes. Des lésions rénales, urétrales, génitales ou rectales peuvent compliquer cette forme. Détectée histologiquement, une atteinte hépatique fréquente se superpose à ces lésions, mais elle reste souvent cliniquement muette.

- *S. mansoni* occasionne des lésions de la paroi intestinale et du foie accompagnées d'une fibrose et d'une hypertension portale secondaire et parfois, à un stade avancé, par des signes pulmonaires et respiratoires. La gravité des lésions hépatiques est liée au développement d'une réaction inflammatoire de type hypersensibilité retardée, aboutissant à la formation des granulomes. Histologiquement, on note l'accumulation successive de nombreux types cellulaires, notamment d'éosinophiles, suivis par des macrophages, des lymphocytes, des cellules épithélioïdes et des fibroblastes. Cette réponse évolue par la suite vers une fibrose cicatricielle.

- L'infection par *S. japonicum* est proche de celle par *S. mansoni* mais la fibrose hépatique se développe plus rapidement.

- *S. intercalatum* est à l'origine d'une symptomatologie dominée par des manifestations rectales.

1.4. Diagnostic

Le diagnostic biologique des schistosomiasés repose sur des techniques de mise en évidence directe des œufs, dans les selles ou les urines. Mais dans la mesure où l'absence de détection des œufs ne permet pas de conclure à l'absence d'infection, le diagnostic des schistosomiasés repose également sur l'utilisation de techniques sérologiques employant des anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques des différents stades du parasite. Des examens cliniques, biologiques (symptomatologie, modifications des constantes sanguines) ou immunologiques (recherche d'antigènes circulants, de complexes immuns) argumentent ainsi le diagnostic, et définissent le stade de la pathologie. L'imagerie médicale (échographie, cystoscopie) permet la visualisation des manifestations les plus tardives comme des fibroses hépatiques ou vésicales. Mais sa pratique reste difficile dans des pays endémiques de par l'absence d'infrastructures locales appropriées, dont le coût élevé en limite la mise en place.

1.5. Lutte contre les schistosomiasés

1.5.1. La prophylaxie sanitaire

La prophylaxie sanitaire qui a pour but d'interrompre le cycle parasitaire a été pendant longtemps la seule méthode de lutte contre les schistosomiasés. Elle consiste à réduire la contamination du biotope aquatique par les excréments humains et à limiter les contacts des populations avec les points d'eau contaminés. Une stratégie globale qui associe

à la politique d'assainissement, à la fois le dépistage, le traitement des populations infectées et une éducation sanitaire des populations à risque, a déjà prouvé son efficacité à Porto Rico, en Arabie Saoudite et au Japon. Mais en raison des coûts élevés et d'une mise en oeuvre difficile, cette stratégie n'a pu s'étendre à tous les pays concernés par la schistosomiase (Capron, 1993).

1.5.2. La lutte anti-vectorielle

Cette stratégie vise à éliminer les mollusques vecteurs indispensables au développement du parasite soit, à l'aide de molluscicides (niclosamide), soit par la réalisation de travaux d'assainissement soit par l'introduction des mollusques compétiteurs ou des prédateurs de mollusques dans le biotope.

Cette stratégie anti-vectorielle ne suffit pas à interrompre le cycle du parasite et n'est pas sans entraîner des risques écologiques. Ainsi les espoirs les plus prometteurs dans ce domaine résident dans la manipulation génétique des mollusques vecteurs.

1.5.3. La prophylaxie médicale

a) La chimiothérapie

Le praziquantel (PZQ), composé de la famille des métradinazoles, représente actuellement le composé le plus utilisé devant l'oxamniquine. Il est actif sur toutes les espèces de schistosomes infectant l'homme et le taux de guérison, déterminé par l'arrêt définitif de l'émission d'oeufs dans les selles, est estimé à environ 90% dans le cas de la schistosomiase à *S. mansoni*. Par son action anti-inflammatoire non-spécifique, le PZQ entraîne également une régression des lésions viscérales peu développées. Ses effets sont principalement ciblés sur les vers adultes, bien qu'il agisse aussi, à un moindre degré, sur les schistosomules et sur les œufs en transit dans les tissus. Il semble modifier le profil des antigènes de surface du schistosome, en exposant notamment certaines enzymes, alors plus accessibles au système immunitaire (Fallon et Doenhoff, 1994 ; Mc Tighe *et al.*, 1995).

L'efficacité de ce traitement est cependant associée à de nombreux effets secondaires dus à la libération massive de toxines et à l'embolisation des parasites morts dans le foie où ils sont dégradés. Il est donc généralement contre indiqué au cours de la grossesse (Homeida *et al.*, 1986 ; Watt *et al.*, 1988). D'autre part, ce médicament semble diminuer l'immunité acquise à la réinfection (Moloney *et al.*, 1987) et, son coût élevé pour des pays en voie de développement, en restreint l'usage en médecine de masse dans les zones d'endémie. De plus, des observations récentes ont mis en évidence une résistance au PZQ en laboratoire (Fallon et Doenhoff, 1994 ; Ismail *et al.*, 1994) et dans certains foyers d'infection naturelle (Sénégal, Egypte) (Fallon *et al.*, 1995).

b) Stratégies vaccinales

Alors que la chimiothérapie représente aujourd'hui le seul moyen d'éliminer le parasite au sein de l'hôte définitif, son utilisation n'est pas dénuée d'effets secondaires et surtout elle ne prévient pas les réinfections fréquentes en zone d'endémie. Le développement de stratégies vaccinales, en complément de la chimiothérapie, a pour vocation de limiter l'expansion des schistosomiasés. Deux caractéristiques propres aux schistosomes sont à prendre en compte dans l'élaboration d'un vaccin : d'une part, les vers ne se multiplient pas dans les tissus de leur hôte définitif et d'autre part, les oeufs sont les principaux responsables de la pathologie et sont un facteur de transmission. Un vaccin qui conduirait à une protection contre le vers, même partielle, associée à une diminution de la fécondité des parasites ou de la réaction granulomateuse autour des œufs limiterait les formes aiguës de la maladie et contrôlerait sa transmission.

Dans cette perspective, l'OMS a retenu six antigènes recombinants parmi de nombreuses molécules à potentiel vaccinant, pour une évaluation chez l'homme (Bergquist, 1995).

*Antigènes de Schistosoma mansoni à potentiel vaccinal retenus par l'OMS
(d'après Bergquist, 1995)*

Antigènes	Taille (kDa)	Localisation	Fonction	Protection			Références
				Souris	Rat	Autre	
Paramyosine (Sm97)	97	Schistosomule Vers adulte	Protéine du Muscle	30	ND	ND	Pearce <i>et al.</i> , 1988
IrV5	62	Tous stades	Protéine du Muscle	50-70	95	25 (babouin)	Amory Soisson <i>et al.</i> , 1992
Triose-phosphate- isomérase (TPI)	28	Tous stades	Enzyme	30-60	ND	ND	Shoemaker <i>et al.</i> , 1992
Sm23	23	Tous stades	Ag de Membrane	40-50	ND	ND	Reynolds <i>et al.</i> , 1992 Köster <i>et al.</i> , 1993
Protéine fixant des acides gras (Sm14)	14	Schistosomule	Ag de Membrane	65	ND	90-100 (lapin)	Tendler <i>et al.</i> , 1996
Glutathion-S- transférase (Sm28GST)	28	Tous stades	Enzyme	30-40	40-60	40-90 (babouin)	Balloul <i>et al.</i> , 1987a Boulangier <i>et al.</i> , 1991a

Le candidat vaccinal le mieux caractérisé, et avec lequel les études d'immunisations et de protections ont été les plus poussées dans notre laboratoire est la Glutathion S-transférase de 28 kDa de *S. mansoni*.

La Sm28GST native recombinante induit une immunité protectrice chez le rat et le hamster (Balloul *et al.*, 1987a et b ; Grezel *et al.*, 1993), le babouin (Balloul *et al.*, 1987c ; Boulanger *et al.*, 1991a) et la souris (Boulanger, *et al.* 1991a : Xu *et al.*, 1993 ; Pancré *et al.*, 1994b ; Wolowczuck *et al.*, 1989). Les taux de protection conférés contre l'infection varient de 50%-70% chez le rat à 30-45% chez la souris, et sont de 30-40% chez le babouin. Ces expériences d'immunisation ont mis en évidence un effet protecteur consistant en une réduction de la charge parasitaire et/ou une réduction de la fécondité des vers femelles, qui se traduit par une diminution des œufs excrétés et/ou une réduction de la charge tissulaire en œufs (Boulanger, *et al.* 1991a ; Wolowczuck *et al.*, 1989).

Xu *et al.* (1991) ont démontré à l'aide d'anticorps monoclonaux, l'implication du site enzymatique de la molécule dans l'immunité anti-fécondité. L'activité enzymatique s'est révélée être portée en partie par les domaines N- et C-terminaux de la protéine (Trottein *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1993) : ainsi, l'immunisation par le peptide C-terminal (peptide 190-211), chez la souris, conduit à la production d'anticorps capables d'inhiber l'activité enzymatique de la Sm28GST, et surtout se traduit par une réduction significative de la charge en œufs dans les tissus ainsi que de leur viabilité *in vivo* et *in vitro*.

Le clonage moléculaire des 28GSTs de différentes espèces de schistosomes a permis de confirmer l'effet anti-fécondité et anti-viabilité des œufs. Les protections peuvent être également observées dans des systèmes hétérologues (*S. haematobium* versus *S. mansoni*). Les travaux ont encouragé l'initiation en phase I de la vaccination par la 28GST (Bihlvax). Le projet s'est essentiellement tourné vers la Sh28GST pour plusieurs raisons. L'acquisition de la résistance est bien corrélée à une baisse de la production d'œufs, la méthode de quantification des œufs au niveau des urines est plus aisée et enfin la schistosomiase urinaire donne l'unique opportunité de suivre par une méthode non invasive l'évolution des lésions inflammatoires associées à l'infection.

2. Réponse immunitaire développée au cours d'une infection à *S. mansoni*

Le développement de moyens de lutte contre la schistosomiase et notamment l'élaboration d'une stratégie vaccinale impliquent la compréhension des mécanismes immunitaires développés par l'hôte au cours de l'infection au niveau humoral et muqueux. Alors que les études réalisées chez l'homme restaient limitées à des analyses épidémiologiques menées sur des populations vivant en régions endémiques, deux modèles animaux ont été couramment utilisés en laboratoire et ont largement contribué aux connaissances sur l'immunologie des schistosomiasés : il s'agit du rat, hôte semi-permissif pour *S. mansoni*, et de la souris, hôte permissif.

2.1. L'immunité naturelle

Le degré de résistance à l'infection par le schistosome est très variable selon les espèces animales étudiées. Kagan (1958) a proposé une classification qui divise les hôtes expérimentaux en 3 catégories en fonction de leur comportement face à l'infection :

- les hôtes **résistants**, comme le pigeon où les cercaires sont détruites au niveau de l'épiderme.

- les hôtes **semi-permissifs**, comme le rat qui rejette les vers adultes avant la ponte. Les vers n'atteignant pas leur maturité, ne pondent pas d'œufs (ou du moins pas d'œufs viables), et ils sont éliminés à la quatrième semaine d'infection (Maddison *et al.*, 1970). De plus, ce modèle développe une forte immunité à la réinfection et fait intervenir des mécanismes dépendants d'anticorps similaires à ceux observés chez l'homme.

- les hôtes **permissifs ou susceptibles** comme la souris, le hamster, le singe Rhesus et le babouin, permettent la maturation complète des parasites et la ponte. La souris constitue le modèle de référence pour l'étude des modifications immuno-pathologiques liées

à la présence des oeufs dans les tissus. D'autre part, l'existence de nombreuses souches parfaitement définies sur le plan génétique permet l'étude, dans ce modèle, du contrôle génétique de la réponse immune dirigée contre le parasite.

L'homme se comporte comme un hôte susceptible chez lequel la durée d'infection peut atteindre des années. Diverses études épidémiologiques réalisées en zone d'endémie de *S. mansoni* et de *S. haematobium* suggèrent l'acquisition d'une résistance à la réinfection avec l'âge (Butterworth *et al.*, 1985 ; Hagan *et al.*, 1985).

Deux autres paramètres semblent aussi influencer l'acquisition d'une immunité :

- le statut génétique de l'individu : certaines familles développent aisément une immunité à la réinfection alors que d'autres non. Un gène à expression co-dominante serait responsable de cette dichotomie (Abel *et al.*, 1991).

- l'intensité de l'infection primaire : plus celle-ci serait lourde, moins le patient deviendrait immun (Dessein *et al.*, 1992).

2.2. L'immunité acquise

L'immunité contre l'infection par le schistosome revêt un caractère très particulier puisque celle-ci est une immunité non stérilisante, efficace contre les formes larvaires de la nouvelle infection, mais inefficace contre les vers adultes déjà présents dans l'organisme. Le terme d'**immunité concomitante** est utilisé pour décrire cette situation où une immunité à la réinfection apparaît en présence d'une infection active (Clegg *et al.*, 1971). Ce concept implique qu'il existe certaines communautés antigéniques entre le schistosome adulte et le schistosomule et que l'adulte vivant dans les vaisseaux sanguins stimule le système immunitaire de l'hôte via la libération de ses produits métaboliques de sécrétion.

De nombreux mécanismes effecteurs ont été caractérisés *in vitro*, chez l'homme et dans des modèles expérimentaux au cours de l'infection. On décrit à la fois une réponse spécifique humorale et cellulaire, ainsi que des phénomènes d'activation des cellules inflammatoires (Capron *et al.*, 1986 ; Sher *et al.*, 1989).

2.2.1. Contexte cellulaire : le modèle murin

La souris développe des mécanismes cellulaires impliquant les populations lymphocytaires T et leur production de cytokines. De nombreuses études réalisées sur ce modèle murin permissif ont permis d'appréhender l'immunopathologie associée à la bilharziose.

L'immunité développée contre *S. mansoni* est thymo-dépendante puisque des souris à fonction thymique déficiente présentent une très faible résistance à la réinfection (Capron *et al.*, 1983 ; Philips *et al.*, 1983). Cependant, les cellules T cytotoxiques sont incapables de lyser le parasite et les lymphocytes T ne semblent pas impliqués directement dans les mécanismes de cytotoxicité contre le parasite (Butterworth *et al.*, 1979b). Ils sont en effet impliqués dans l'immunité protectrice mais de manière indirecte, par le biais des cytokines qu'ils sécrètent.

Chez la souris, il existe deux sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ auxiliaires (T helper), Th1 et Th2, caractérisées par leur production différentielle de cytokines : les cellules Th1 produisent de l'IL-2, de l'IFN- γ et de l'IL-12, alors que les cellules Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13 (Mosmann *et al.*, 1986; Cherwinski *et al.*, 1987, Fiorentino *et al.*, 1989). Par la suite, Firestein *et al.* (1989) ont montré l'existence de cellules Th0, précurseurs des cellules Th1 et Th2, produisant simultanément de l'IL-2, de l'IFN- γ et de l'IL-4. Au cours de la schistosomiase murine, la réponse cellulaire développée chez l'hôte définitif commute d'un profil Th1 vers un profil Th2 avec l'évolution du parasite. Ainsi, alors que les schistosomes induisent une réponse cellulaire de type Th1, l'apparition des oeufs dans les tissus conduit à une réponse cellulaire de type 2, dominante aux environs de la 8^e semaine après l'infection (Grzych *et al.*, 1991; Pearce *et al.*, 1991). Cet effet des oeufs de schistosome sur la polarisation peut aussi s'exercer à l'encontre d'un antigène irrelevant du schistosome, décrit comme inducteur d'une réponse de type Th1 (Kullberg *et al.*, 1992).

Des expériences de neutralisation des cytokines Th2 (IL-4 et IL-5) à l'aide d'anticorps se sont avérées sans effet sur la résistance à l'infection (Sher *et al.*, 1990).

Cependant, l'existence de souris déficientes en IL-4 (qui ne développent alors pas de réponse Th2 efficace) (Pearce *et al.*, 1996) a permis de montrer les effets protecteurs de cette cytokine principalement sur les manifestations pathologiques observées en phase aiguë de la schistosomiase mais également sur la charge vermineuse lors d'expériences de réinfection (Rosa Brunet *et al.*, 1997).

En parallèle, l'étude de la réponse immune suite à l'infection par des cercaires irradiées (qui empêche la maturation du parasite et qui confère une protection à la réinfection) montre la prédominance d'une réponse Th1, caractérisée par la production d'IFN- γ (Smythies *et al.*, 1992b). Le rôle majeur de l'IFN- γ dans l'immunité protectrice est également confirmé *in vitro* puisqu'il active les macrophages qui sont alors capables de lyser les schistosomules (James *et al.*, 1984; 1994; Pearce, 1993; Oswald *et al.*, 1994).

L'importance de ces deux cytokines est confirmée chez l'homme où la résistance à l'infection est liée à la présence de cellules CD4+ Th0/2 qui sécrètent plus d'IL-4 que d'IFN- γ majoritairement (Th0/Th1) (Coussinier-Paris et Dessein, 1995). Ces observations sont en accord avec le rôle des IgE (dont la présence est sous dépendance de l'IL-4) dans la protection contre *S. mansoni* et indiquent que l'IFN- γ contribue à l'expression de l'immunité. Deux études ont montré une association entre de faibles taux d'infection (DeJesus *et al.*, 1993) ou de réinfection (Roberts *et al.*, 1993) et une prolifération lymphocytaire T vis-à-vis d'antigènes d'oeufs et de vers adultes. Une faible production d'IFN- γ a été observée alors que la production d'IL-5 était significative. Dans l'une de ces études (Roberts *et al.*, 1993), il a été rapporté une corrélation âge-dépendante significative entre cette production d'IL-5 en réponse à une stimulation par les antigènes d'oeufs, et de faibles taux de réinfection. D'autre part, des études menées au Kenya (Mwatha *et al.*, 1998) ont permis d'associer des taux importants d'IFN- γ et de TNF, avec parallèlement de faibles taux d'IL-5, à des cas d'hépatosplénomégalie chez l'homme.

2.2.2. Contexte humoral : mécanismes effecteurs chez le rat et chez l'homme

Des études réalisées chez le rat ont permis de caractériser en partie la composante humorale développée par l'hôte, suite à une infection par *S. mansoni*. Cet hôte semi-permissif est un modèle d'étude intéressant puisqu'il devient résistant à la réinfection. Cette immunité à la réinfection met en place des mécanismes de **cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps** ou ADCC (pour « antibody dependent cellular cytotoxicity »), faisant intervenir des anticorps d'isotype IgG et IgE ainsi que la participation de cellules pro-inflammatoires non lymphoïdes telles que les macrophages (Capron *et al.*, 1975 ; Perez *et al.*, 1975 ; Joseph *et al.*, 1978), les éosinophiles (Butterworth *et al.*, 1974 ; Capron *et al.*, 1978 ; Capron *et al.*, 1981) et les plaquettes (Joseph *et al.*, 1983). Cette activité cytotoxique dépendante des plaquettes ou des éosinophiles est maximale entre 7 et 8 semaines après l'infection chez le rat. Ces mécanismes ont été confirmés *in vivo*, chez le rat, par la protection obtenue après transfert passif d'anticorps monoclonaux cytotoxiques d'isotype IgG2a, spécifiques d'une glycoprotéine de 38kDa du parasite, ou d'isotype IgE spécifiques d'un antigène de 26kDa (Grzych *et al.*, 1982 ; Verwaerde *et al.*, 1986). Par ailleurs, des anticorps de même spécificité antigénique sont capables d'inhiber cette cytotoxicité (Capron *et al.*, 1987) : ces anticorps, IgG2c chez le rat (Grzych *et al.*, 1984), sont dits "**bloquants**" de par leur capacité à neutraliser l'interaction cellules effectrices/anticorps/schistosomule (cf § 2.4.3.). L'injection intra-dermique ou sous-cutanée d'éosinophiles et de macrophages provenant de rat infectés confirme *in vivo* le rôle effecteur cytotoxique de ces deux populations (Capron *et al.*, 1984).

Ces travaux réalisés chez le rat, ont trouvé toute leur dimension lorsque des études épidémiologiques effectuées en régions endémiques ont mis en évidence les mêmes types de mécanismes immunitaires chez l'homme. En effet, des mécanismes d'ADCC mettant en jeu des IgG et des éosinophiles ont été décrits chez l'homme (Butterworth *et al.*, 1975a et b; Khalife *et al.*, 1989). Des études réalisées au Kenya ont montré la présence d'anticorps IgM sériques capables de bloquer la cytotoxicité dépendante des éosinophiles médiée par les IgG. Ainsi, l'intensité de réinfection peut être corrélée positivement avec la présence d'IgM

et d'IgG2 spécifiques d'épitopes carbohydrates présents dans les antigènes d'oeufs (Khalife *et al.*, 1986; Butterworth *et al.*, 1987; Dunne *et al.*, 1988). De même, des anticorps IgG4 seraient associés à la susceptibilité à l'infection, aussi bien par *S. haematobium* que par *S. mansoni* (Hagan *et al.*, 1991; Rihet *et al.*, 1992; Demeure *et al.*, 1993).

D'autre part, des études réalisées en Gambie par Hagan *et al.* (1991) ont suggéré le rôle important des IgE. En effet, une corrélation négative a été observée entre l'intensité de réinfection par *S. haematobium*, et des taux élevés d'IgE spécifiques, indiquant donc l'implication de ces anticorps dans la protection. Deux études épidémiologiques s'appliquant à une infection par *S. mansoni* chez des populations kenyanes (Dunne *et al.*, 1992) et brésiliennes (Rihet *et al.*, 1991; Demeure *et al.*, 1993) sont venues confirmer ces observations. Enfin, plus récemment, une association positive entre le taux d'anticorps IgG, spécifiques de l'antigène Sm28GST de *S. mansoni*, et l'acquisition de l'immunité à la réinfection dépendante de l'âge a été observée (Auriault *et al.*, 1990; Grzych *et al.*, 1993).

L'ensemble de ces informations montre que le schistosomule semble donc être la cible principale de la réponse immune, dont les degrés variables de susceptibilité et de résistance à la réinfection sont liés à un rapport entre l'expression d'anticorps effecteurs et celle d'anticorps bloquants.

2.2.3. Place particulière de la réponse IgA

a) Réponse IgA et schistosomiase

Différentes observations ont révélé le rôle des IgA sériques, et plus particulièrement des IgA spécifiques de l'antigène Sm28GST, dans l'expression d'une immunité anti-schistosome. Une étude menée chez des patients kenyans infectés par *S. mansoni* (Grzych *et al.*, 1993) a mis en évidence une association entre les taux d'IgA spécifiques de l'antigène Sm28GST et l'acquisition d'une résistance à la réinfection. Neutralisant l'activité enzymatique *in vitro*, cet isotype altère la fécondité des schistosomes en limitant la ponte des oeufs mais également en réduisant leur capacité à éclore et à libérer des miracidis

viables. Très récemment, une étude menée sur des sujets infectés par *S. mansoni* au Sénégal (Remoué *et al.*, 1998) confirme les propriétés neutralisantes des IgA, préférenciellement chez les femmes.

D'autre part, des propriétés larvicides de cet isotype ont été mis en évidence par des études conduites chez le rat immunisé par l'antigène Sm28GST (Grezel *et al.*, 1993).

b) Propriétés des anticorps IgA muqueux

Les anticorps IgA sont présents dans le sérum à des concentrations relativement faibles comparées à celles des IgG : elles sont en fait imputables à un catabolisme hépatique plus rapide que celui des IgG (la demi-vie d'une IgA est de 5 jours contre 20 à 25 jours pour une IgG) (Mestecky, 1992). L'IgA est l'isotype majeur des muqueuses par excellence et, de part l'étendue des surfaces muqueuses, il représente l'isotype le plus synthétisé par l'organisme ! (Mestecky et Mc Ghee, 1987)

Ses propriétés spécifiques en font un anticorps idéal dans la protection des surfaces muqueuses. En effet, l'IgA sécrétoire est plus résistante que les autres isotypes face aux dégradations protéolytiques qui peuvent avoir lieu par exemple au niveau intestinal (Schuster, 1971 ; Underdown et Dorrington, 1974). Exudées ou transportées dans les sécrétions, le rôle de barrière physique des IgA se traduit par l'exclusion immune de pathogènes présents dans la lumière intestinale : elles peuvent en effet empêcher l'adhérence des pathogènes aux cellules épithéliales en les agglutinant (Armstrong *et al.*, 1992). Des études plus récentes ont également démontré que les IgA pouvaient être neutralisantes au sein même des cellules épithéliales lors de leur transcytose vers la lumière (Mazanec *et al.*, 1993), et au niveau de la *lamina propria* (Lamm *et al.*, 1995). Elles peuvent d'autre part neutraliser des enzymes et toxines de bactéries entériques (Majumdar et Ghose, 1991 ; Lycke *et al.*, 1987). Un autre avantage considérable des IgA, à l'opposé des IgG ou des IgM, est leur faible capacité à activer le complément et donc à engendrer des phénomènes inflammatoires dans la défense de sites muqueux en état de constante stimulation (Pfaffenbach *et al.*, 1982). Enfin, elles peuvent limiter l'absorption d'antigènes alimentaires et par conséquent préserver d'une sur-activation du système immunitaire conduisant à des allergies atopiques ou à des maladies auto-immunes.

Cet isotype peut donc être considéré comme la première ligne de défense vis-à-vis de divers pathogènes, et de façon notoire dans le cas de la schistosomiase à *S. mansoni*, puisque trois sites muqueux sont principalement exposés aux antigènes parasitaires : le premier site atteint est la peau (ou S.A.L.T. pour « skin-associated lymphoid tissue »), à travers laquelle pénètre la forme infestante ; le deuxième site correspond aux poumons (ou B.A.L.T. pour « bronchus-associated lymphoid tissue ») qui abritent le schistosomule ; et enfin, la muqueuse intestinale (ou G.A.L.T. pour « gut-associated lymphoid tissue »), lieu de ponte et par conséquent de la pathologie elle-même.

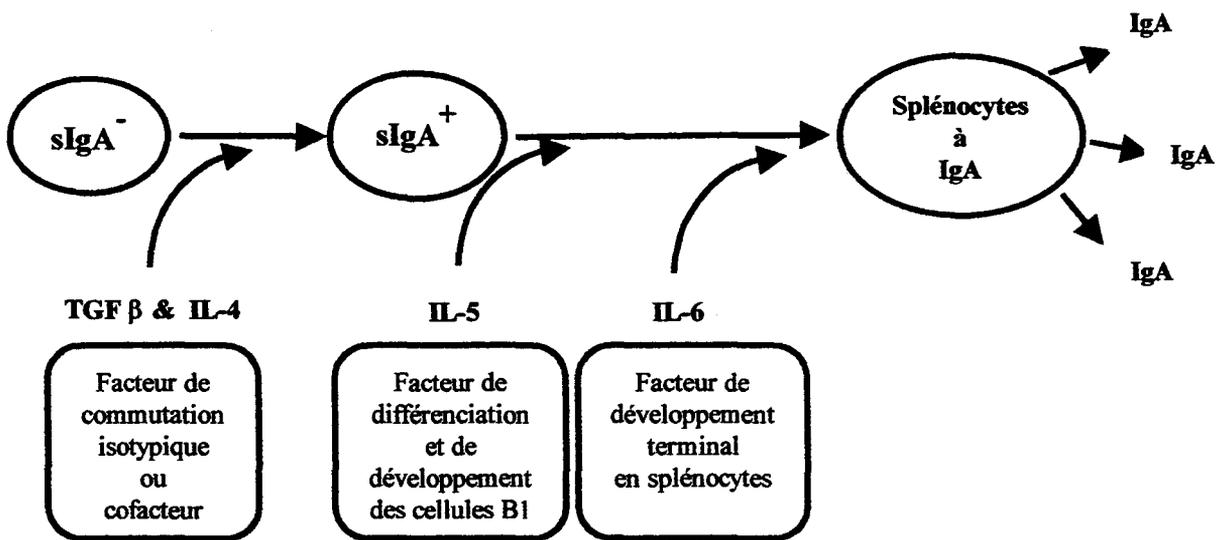
c) Régulation de la réponse IgA par les interleukines

Un grand nombre d'études menées *in vitro* ou *in vivo* ont validé le rôle majeur des cytokines de type Th2, particulièrement de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-6, dans le développement d'une réponse IgA muqueuse.

Les étapes de différenciation conduisant à la production d'IgA sont séquentielles. Après l'activation des lymphocytes B IgM⁺, la première est l'étape de **commutation** des chaînes lourdes des immunoglobulines vers la chaîne α qui implique l'expression des transcrits C α . Cette étape est dépendante chez l'homme comme chez la souris, de la présence du TGF- β . Cette cytokine induit la commutation isotypique des lymphocytes B IgA⁻ en lymphocytes B IgA⁺ (Coffman *et al.*, 1989 ; Lebman *et al.*, 1990). L'IL-2, l'IL-4 et l'IL-5 augmentent également la sécrétion d'IgA dans les systèmes de culture *in vitro* (Coffman *et al.*, 1987 ; Sonoda *et al.*, 1989 ; Ehrhardt *et al.*, 1992). L'action synergique de l'IL-4, à la différence de l'IL-2 ou de l'IL-5 semble promouvoir la commutation vers les lymphocytes B IgA⁺ (Lin *et al.*, 1991 ; Wakatsuki et Strober, 1993). Chez l'homme, l'IL-10 coopère avec le TGF- β et induit la sécrétion d'IgA (Defrance *et al.*, 1992). Dans les cas pathologiques de déficience en IgA, elle lève le blocage de la différenciation et entraîne l'apparition de plasmocytes à IgA (Brière *et al.*, 1996).

L'IL-5 et l'IL-6 interviennent après l'expression des IgA membranaires. Ils agissent au niveau des **étapes de différenciation et de maturation terminales**. L'IL-5 augmente *in*

in vitro la réactivité des lymphocytes B IgA⁺ seule ou en synergie avec l'IL-4, l'IL-6 ou le TGF- β (Beagley *et al.*, 1988 ; Murray *et al.*, 1987 ; Kunimoto *et al.*, 1989 ; Coffman *et al.*, 1989). Ceci a été confirmé *in vivo* chez des animaux infectés par un virus recombinant exprimant l'IL-5 (Ramsay et Kohonen-Corish, 1993). L'IL-6, quant à elle, est une cytokine multi-fonctionnelle : impliquée dans la différenciation terminale des lymphocytes B IgA⁺ en plasmocytes sécréteurs d'IgA, elle augmente la sécrétion *in vitro* des IgA à partir de lymphocytes B déjà commutés (Beagley *et al.*, 1989 ; 1991).



Activités de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-6 dans le développement de cellules B muqueuses

Ramsay et al (1996) Essentials of mucosal immunology, by Academic press

Ces différentes études menées *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées exclusivement chez l'homme ou chez la souris. La physiologie particulière du rat limitait en effet leurs applications dans ce modèle, dans la mesure où le foie de certains rongeurs fonctionne tel une « pompe à IgA » qui régule leur taux en les transportant vers la bile (Vaerman *et al.*, 1997). Disposant d'un modèle où il était possible d'instaurer une réponse IgA muqueuse chez le rat, une de nos approches a consisté à caractériser la cascade de cytokines produites à cet effet, au niveau de différents organes.

2.4. Stratégies d'échappement développées par le parasite

2.4.1. Mimétisme moléculaire

Le schistosome a la capacité de détourner des composantes de l'hôte où il se développe. Ainsi, le schistosomule peut acquérir passivement différentes molécules, notamment des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Sher *et al.*, 1978) ou des antigènes du groupe sanguin (Dean, 1974 ; Goldring *et al.*, 1976). Les schistosomes sont alors masqués au système immunitaire et deviennent plus résistants aux mécanismes effecteurs (Damian, 1967).

Le mimétisme moléculaire peut se traduire également par l'expression de structures antigéniques analogues à celles de l'hôte (Capron, 1995b). Chez *S. mansoni*, l'augmentation de la production des œufs par les vers femelles, suite à l'injection de TNF α , chez des souris SCID, semble indiquer que le parasite est capable non seulement d'exprimer des protéines possédant des homologies avec les récepteurs présents chez l'hôte, mais aussi de détourner la réponse de l'hôte à son avantage (Amiri *et al.*, 1992). De même, la production locale d'IL-7 présenterait un effet positif sur la survie des larves infectantes, après infection par voie cutanée, et aurait une action directe sur la migration du parasite dans l'hôte infecté (Auriault *et al.*, 1996).

2.4.2. Immunosuppression

Les travaux de Dessaint *et al.* (1977) ont montré que les schistosomes adultes libèrent un facteur appelé SDIF (pour « schistosome-derived inhibitory factor ») qui inhibe la dégranulation mastocytaire et la réponse IgE chez le rat, diminuant ainsi l'activation des éosinophiles (Mazingue, 1980). De plus, le SDIF inhibe *in vitro*, la réponse proliférative des lymphocytes aux antigènes parasitaires ou à la stimulation par l'IL-2 (Mazingue *et al.*, 1983 et 1986).

Certaines protéases du parasite peuvent également dégrader les IgG fixées sur les schistosomules, donnant naissance à des peptides possédant des fonctions

immunomodulatrices *in vitro* sur les macrophages (Auriault *et al.*, 1981). La cytotoxicité macrophage dépendante est également diminuée en présence de ces peptides, dont la composante essentielle est un tri-peptide (TKP) (Auriault *et al.*, 1983a).

Le schistosome est également capable de fixer ou d'exprimer certains facteurs tels que le SCIP-1 (pour "schistosome complement inhibitor"), ou des protéases (m28) (Marikovsky *et al.*, 1988b) qui altèrent l'efficacité des réactions de défense non spécifiques médiées par les voies du complément (Fishelson, 1995). De même, l'expression de serpines (pour « serine protease inhibitor ») permet au parasite de neutraliser certains composants de la réaction inflammatoire, ainsi par exemple la protéine parasitaire Smpi56 inactive l'élastase produite par les neutrophiles (Ghendler *et al.*, 1994).

Enfin, la libération active de neuropeptides par le schistosome comme l'adénocorticotropine (ACTH), l'hormone de stimulation des mélanocytes (α MSH) ou encore la β -endorphine, a été démontrée récemment : Duvaux-Miret *et al.* (1992) rapportent leur rôle immunosuppresseur aussi bien sur les immunocytes de l'hôte intermédiaire gastéropode que sur les monocytes de l'hôte vertébré.

2.4.3. Anticorps bloquants

Ce sont des anticorps dont la production est induite par le parasite. Ils sont capables d'inhiber la formation des complexes cellules effectrices /anticorps/ schistosomules, en entrant en compétition sur une même cible, soit un antigène de surface du parasite (cf § 3.4.), soit sur les récepteurs cellulaires Fc. Cette inhibition de la cytotoxicité s'opère *in vitro*, et *in vivo* (Grzych *et al.*, 1984).

3. Carbohydrates et schistosomes

L'intérêt porté aux glycoconjugués de schistosome, essentiellement des antigènes de surface donc des cibles potentielles, a été suscité par les études originales menées par différents groupes relatant leur antigénicité, leur application au diagnostic, mais surtout leur importance dans la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de ce parasite.

3.1. Antigènes glycaniques spécifiques de stades parasitaires

Les différents glycoconjugués antigéniques que nous évoquerons proviennent des stades successifs que revêt le schistosome : il s'agit du glycocalyx de la furcocercaire; des glycoprotéines présentes sur la membrane du ver adulte et de ses sécrétions intestinales; ou encore des glycoprotéines et glycolipides d'oeufs.

Il faut noter que les schistosomes peuvent absorber des carbohydrates de l'hôte contenant des glycoprotéines et des glycolipides tels que des antigènes du groupe sanguin (Goldring, 1976). Ils peuvent même importer divers sucres dont le glucose, le galactose, le mannose et la glucosamine (Pappas, 1975). Ces propriétés ont ainsi permis d'étudier la structure et le métabolisme de glycoconjugués nouvellement synthétisés à partir de sucres précurseurs radiomarqués.

Précisons enfin que les 3 classes suivantes de glycoconjugués sont portées par tous les parasites et par le reste du règne animal et végétal: les glycosphingolipides, qui sont constitués d'une partie oligosaccharidiques attachée à un céramide, les O-glycanes et les N-glycanes des glycoprotéines, ces deux derniers étant distingués en fonction du type de glycosylation.

L'exposition des sucres à la surface des trématodes est dépendante de l'espèce et du stade de développement (libre ou intra-mollusque) (Horak et van der Knaap, 1997).

3.3.1. Le glycocalyx

La cercaire de *S. mansoni* est recouverte d'une structure dense, de l'ordre de 1 à 2 μm d'épaisseur, appelée glycocalyx, composée d'oligosaccharides dont le principal est le fucose (Caulfield *et al.*, 1987 et 1988; Nanduri *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1994). Les glycoprotéines de la furcocercaire contiennent pour la plus grande partie des O-glycanes représentés sur le parasite (Khoo *et al.*, 1995). Cette structure semble conférer une protection envers les importants changements de pression osmotique que subissent ce stade larvaire lors de sa vie libre : elle se détache de la cercaire en partie, après pénétration au travers de la peau. Lors de la transformation de la cercaire en schistosomule, le glycocalyx continue à se détacher pour laisser place à un nouveau tégument : on observe alors un changement dans le profil de reconnaissance par des lectines (Horak, 1995).

La surface des schistosomules est également riche en glycoconjugués. En effet, la plupart des anticorps qui reconnaissent la surface de la jeune larve sont dirigés contre des épitopes oligosaccharidiques (Omer Ali *et al.*, 1988). Là encore un changement dans les déterminants de surface apparaît lors de la transformation du schistosomule en ver adulte (Simpson *et al.*, 1983).

3.3.2. Les glycoprotéines de la membrane du ver adulte

Elles sont constituées de galactose et de taux importants de fucose, organisés en complexes de type N-glycane (Srivatsan *et al.*, 1992). Or le galactose est absent des O-glycanes et des N-glycanes du schistosomule. Cette observation conduit donc à considérer la notion fondamentale de l'existence d'une **régulation au cours du développement** dans la biosynthèse des glycanes, probablement grâce à la régulation de certaines enzymes telles que la β 1,4 galactosyltransférase (GalTs) et la β 1,3GalTs uniquement mises en évidence au niveau du stade de ver adulte.

3.3.3. Les antigènes circulants

La première identification de glycoconjugués immunogéniques de schistosome concernent des glycoprotéines circulantes excrétées par l'intestin du parasite (Nash *et al.*, 1978; Deelder *et al.*, 1980), plus connues sous la dénomination d'antigènes circulants anodiques (CAA) et d'antigènes circulants cathodiques (CCA). *In vitro*, ils peuvent être excrétés par le parasite immédiatement après sa transformation en schistosomule (Van Dam *et al.*, 1996). Le CCA contient 80% de carbohydrates, essentiellement des O-glycanes, ainsi que l'antigène Lewis x (Le^x) ($Gal\beta 1-4[Fuca 1-3]GlcNAc\beta 1-R$) et des structures poly Le^x ; quant au CAA, il est constitué d'environ 30% de carbohydrates, pour la plupart des N-acétylgalactosamines (GalNAc) et des acides glucuroniques (GlcA).

Détectés dans les urines pour le CCA et dans le sérum pour le CAA, ces antigènes glycaniques sont largement utilisés en **diagnostic** (Van Lieshout *et al.*, 1995), avec une place tout particulièrement significative quant à la production et/ou la clearance du CAA dans le diagnostic de la schistosomiase humaine à *S. japonicum* ou à *S. haematobium* (Ndhlovu *et al.*, 1996). Le **suiti de l'infection** par *S. mansoni* est réalisable en raison d'une corrélation entre le taux de CCA dans le sérum de patients et le nombre d'oeufs fécaux, traitable par du praziquantel (Barsoum *et al.* ;, 1991).

Un autre antigène circulant de nature carbohydrate a été mis en évidence au niveau des sérums et urines de patients infectés (Carlier *et al.*, 1978 ; 1980). Nommé antigène M, il est également excrété au niveau de l'intestin des vers adultes de schistosome.

3.3.4. Les antigènes de l'oeuf

Les glycoprotéines d'oeuf comprennent un taux important de mannose et un large panel de N-glycanes complexes, pourvus de **structures terminales multifucosylées spécifiques et uniques** à *S. mansoni* (déjà identifiées sur les O-glycanes du glycocalyx et sur les glycosphingolipides des oeufs). Ces structures constitueraient donc les épitopes communs entre les oeufs et les cercaires de cette espèce (Khoo *et al.*, 1997a et b).

De nombreux glycanes sont portés par les oeufs de schistosome: leur spécificité et leur stabilité suggèrent leur implication dans la réactivité sérologique vis-à-vis du parasite (Hamburger *et al.*, 1982a; Norden *et al.*, 1984; Weiss *et al.*, 1985, Lustigman *et al.*, 1985). Ainsi par exemple, la glycoprotéine majeure d'extraits solubles d'oeufs (SEA) de *S. mansoni* (de souche égyptienne) est une molécule de 70 kDa de poids moléculaire, qui aurait un potentiel sérodiagnostic (Hamburger *et al.*, 1982b).

Le tableau non exhaustif présenté page suivante, rassemble différentes natures d'antigènes glycaniques retrouvés selon le stade considéré du parasite.

Remarquons que contrairement aux glycoprotéines animales en général, on n'observe pas la présence d'acide sialique ni de glycoprotéines sulfatées chez *S. mansoni* (Nyame *et al.*, 1987 ; 1988).

*Nature de différents antigènes glycaniques
spécifiques de stades parasitaires de schistosomes*

Stades parasitaires	Glycoconjugués	Références
Furcocercaires (glycocalyx) Le ^x	Fuc majoritaire; NAcGlc; NAcGal; Gal; répétition d'un trisaccharide inhabituel [->3NAcGalβ1-4NAcGlcβ1-3Galα1 ->]n	(Xu <i>et al.</i> , 1994) (Nanduri <i>et al.</i> , 1991) (Caulfield <i>et al.</i> , 1988)
Schistosomules Gal	GlcA; Man; pas de Gal; essentiellement antigène Tn; peu antigène T	(Nyame <i>et al.</i> , 1988)
Vers adultes -Antigènes membranaires -Sécrétions intestinales	Antigènes T et Tn; résidus NAcGlc liés en O-; GlcA; Man; Gal; N-glycane: taux important de Fuc, NAcGal, pas d'acide sialyque; Antigènes Le ^x et polyLe ^x ; glycosphingolipides de petites tailles caractéristiques: NAcGal-β1-4Glcβ1- céramide (ou "schisto" core) Antigène M : 63% de carbohydrates, avec des O-glycane, Fuc, Gal, Man CAA : 30% de carbohydrates, pour la plupart NAcGal et GlcA (d'où caractère anionique), avec des taux mineurs de Fuc, Gal, Xyl et Glc CCA (essentiellement ver femelle): 80% de carbohydrates, des O-glycane de hauts poids moléculaires caractérisés par le motif core-2 [NAcGlcβ1-6(Galβ1- 3)NAcGalα1-Thr/Ser-R]; antigènes Le ^x et polyLe ^x	(Nyame <i>et al.</i> , 1987) (Nyame <i>et al.</i> , 1989) (Srivatsan <i>et al.</i> , 1992) (Makaaru <i>et al.</i> , 1992) (Carlier <i>et al.</i> , 1980) (Nash <i>et al.</i> , 1978) (Deelder <i>et al.</i> , 1980) (Bergweff <i>et al.</i> , 1994) (Van Dam <i>et al.</i> , 1994)
Oeufs	Man; structures multifucosylées glycosphingolipides très inhabituels	(Khoo <i>et al.</i> , 1997) (Makaaru <i>et al.</i> , 1992)

Sucre sous contrôle au cours du développement du parasite:

Abréviations: GlcA, glucosamine; NAcGlc, Nacétylglucosamine; Glc, glucose; Man, mannose; Gal, galactose; Fuc, fucose; Xyl, xylose; LacA, Lactosamine

3.2 Fonctions

3.2.1. Survie du parasite

Il a été décrit que des oligosaccharides de membrane pouvaient jouer un rôle essentiel dans l'**adaptation osmotique** de microorganismes (Miller *et al.*, 1986). Ceci laisse donc penser que l'adaptation aux modifications brusques d'osmolarité (notamment entre le stade larvaire aquatique et le stade schistosomule au niveau des tissus de l'hôte définitif) serait liée à certaines structures glycaniques de surface.

Les antigènes CAA et CCA seraient quant à eux impliqués dans la **protection de l'intestin du schistosome** exposé en permanence au système immunitaire inné et acquis de l'hôte: le CAA est en effet capable de lier, par ses extrémités collagène-like, le composant C1q du complément, mais sans l'activer (Van Dam *et al.*, 1993).

3.2.2. Rôle des glycanes chez l'hôte vertébré

a) Potentiel immunomodulateur du glycocalyx et des antigènes de l'oeuf

Le glycocalyx est une structure extrêmement immunogène (Dalton *et al.*, 1987; Harn *et al.*, 1984; Dissous *et al.*, 1982; Kemp *et al.* 1970; Mc Laren and Hockley 1976; Samuelson and Caulfield, 1985). Certains oligosaccharides rapportés (Khoo *et al.*, 1995), notamment des structures oligofucosylées peuvent rendre compte du **potentiel immunomodulateur** du glycocalyx qui se manifeste par:

- l'activation du complément par la voie alterne (Machado *et al.*, 1975; Samuelson and Caulfield, 1986)

- l'hypermotilité de type retardée observée dans les stades précoces d'infection (Khoo *et al.*, 1995).

- la prolifération spécifique des cellules B (Xu *et al.*, 1993).

Cependant, une immunisation avec une préparation grossière de glycocalyx conduit à une augmentation de la charge en vers adultes ce qui suggérerait une **fonction immunosuppressive** locale de cette structure (Harn *et al.*, 1989). Le milieu dans lequel la furcocercaire s'est transformée en schistosomule *in vitro* peut supprimer la prolifération de

lymphocytes du sang périphérique stimulés par un mitogène (Veira *et al.*, 1986). Des travaux révèlent par ailleurs une réactivité croisée entre le glycocalyx et les glycolipides dérivés de l'oeuf (Weiss et Strand 1985 ; Weiss *et al.*, 1986; Levery *et al.*, 1992).

La plus grande partie de la réponse immunitaire spécifique des oeufs et du schistosomule est dirigée contre des antigènes carbohydrates (Capron, 1987) et les anticorps spécifiques de ces glycanes ont un **rôle important dans la protection** acquise lors de la schistosomiase expérimentale (Norden et Strand, 1984; Omer Ali *et al.*, 1986). Différentes fractions partiellement purifiées ont montré diverses **propriétés fonctionnelles** telles que:

- l'induction d'une réponse blastogénique de lymphocytes issus de souris infectées à 8-9 semaines (Carter et Colley, 1979)

- l'induction d'une réponse granulomateuse

- des réactivités sérologiques, dermiques et hépatotoxiques (Boros et Warren, 1992; Brown et Smith, 1977; Dunne *et al.*, 1981 ; Harn *et al.*, 1989).

Enfin la ponte des oeufs constitue désormais clairement le stimulus majeur qui, au cours de la schistosomiase murine, polarise la réponse immunitaire vers un profil de type Th2, voire même qui régulerait négativement la production initiale de cytokines de type Th1 (Grzych *et al.*, 1991; Pearce *et al.*, 1991; Wynn *et al.*, 1993). Ce mécanisme de commutation dans le profil de la réponse immunitaire impliquerait la participation de l'IL-10 (Fiorentino *et al.*, 1989; Sher *et al.*, 1991), cytokine produite lors de la stimulation de cellules B issues de souris infectées par *S. mansoni*, et celle de l'oligosaccharide lacto-N-fucopentaose (LNFP-III), qui contient tout particulièrement le trisaccharide Le^x (Velupillai et Harn, 1994). Dans ce contexte, il s'agit de la première évidence de l'influence directe d'un glycanes sur la réponse immunitaire.

Les travaux de Poulain-Godefroy *et al.* (1996) ont démontré, toujours dans le modèle murin, que les réponses IgG et IgA sont très fortement augmentées après une oviposition. D'autre part, les réponses IgA sériques et intestinales spécifiques des différents stades parasitaires s'avèrent très réduites en absence d'oeufs, chez des animaux soumis à une infection monosexuée. Ces observations suggéraient donc que parallèlement à leur rôle

polarisateur de la réponse Th2, les antigènes d'oeufs du schistosome stimulent la production d'IgA spécifiques.

b) Glycanes et réaction granulomateuse

La forme pathologique de la schistosomiase hépatique implique la formation de granulomes autour des oeufs piégés dans le système portal vasculaire, conduisant à une fibrose hépatique (Warren, 1972). La réaction granulomateuse est essentiellement une réponse immunitaire à médiation cellulaire dirigée contre des antigènes sécrétés par les oeufs vivants matures (Boros et Warren, 1970; Hang *et al.*, 1974). Les sécrétions de l'oeuf, produites en partie par le miracidium en développement, sont relarguées *in vivo* au travers des micropores de la coquille (Smithers et Doenhoff, 1982): protéines, glycoprotéines (Warren *et al.*, 1967) et polysaccharides sécrétés induisent et influencent alors la réponse immunitaire chez l'hôte définitif (Hamburger *et al.*, 1982a ou b).

Les glycanes de schistosome auraient donc un rôle prépondérant dans la formation du granulome. Ainsi certains déterminants carbohydrates de glycoprotéines d'oeufs, mais également de vers adultes mâles, sont capables *in vivo* de stimuler la formation d'un granulome artificiel (Boros et Warren, 1970 ; Boros *et al.*, 1973, 1977; Weiss *et al.*, 1987).

De même, les glycanes de l'hôte auraient une place à tenir dans cette réaction pathologique: les protéoglycanes héparane-sulfatés associés aux membranes cellulaires des myofibroblastes auraient une activité stimulatrice sur la prolifération extramédullaire de cellules myéloïdes impliquées dans la réaction inflammatoire du granulome (Alvarez-Silva *et al.*, 1993). Des protéines adhésives de l'hôte peuvent également jouer un rôle dans la formation et/ou la régulation du granulome. En effet, la L-sélectine est exprimée sur les cellules entourant l'oeuf, mais, soluble, elle peut traverser les pores de la coquille et être retrouvée liée à la surface membranaire des miracidia (El Ridi *et al.*, 1996).

3.2.3. Rôle des glycanes chez l'hôte intermédiaire

Les glycanes du parasite peuvent également être importants chez l'hôte intermédiaire. Récemment deux lectines ont été identifiées dans l'hémolymphe de *Biomphalaria alexandrina*, mollusque vecteur de *S. mansoni* (Mansour, 1995). Ces lectines, constituant une famille oligomorphique (Mansour *et al.*, 1995), se lient aux miracidia suggérant que les glycanes internes aux miracidia pourraient être impliqués dans la propagation ou le maintien du parasite dans l'hôte intermédiaire, et également dans la régulation de la réponse du mollusque vis-à-vis du schistosome. Ainsi des carbohydrates associés à la surface tégumentaire du sporocyste primaire de *S. mansoni*, pourraient servir de récepteurs potentiels pour médier la reconnaissance par le système interne de défense du mollusque hôte, *B. glabrata* (Johnston *et al.* et Yoshino, 1996). De plus, en utilisant la lectine dérivée de *B. alexandrina* spécifique du déterminant fucosyllactose associé à *S. mansoni*, il a été possible de caractériser respectivement des glycoprotéines de 37 kDa et 40 kDa sur les vers mâles adultes et sur les furcocercaires (Mansour, 1996; Negm, 1996).

3.3. L'antigène Lewis x

Les études menées par Ko *et al.* (1990) ont mis en évidence la synthèse par *S. mansoni* de glycanes contenant le déterminant Le^x, encore appelé SSEA-1 ("Stage Specific Embryonic Antigen"), CD15 ou haptène X. C'est un antigène que l'on retrouve sur les leucocytes humains, monocytes, neutrophiles et autres tissus. A l'origine décrit par des anticorps monoclonaux préparés contre des antigènes d'oeufs, le Le^x est également présent sur de nombreuses glycoprotéines liées à la membrane tégumentaire du schistosome adulte mâle et femelle, sur l'épithélium intestinal et dans le CCA. On a pu également récemment caractériser une α 1-3fucosyltransférase chez le parasite adulte (De Bose-Boyd *et al.*, 1996). Son expression serait sous contrôle au cours du développement puisqu'il n'apparaît ni au niveau du miracidium, ni au niveau de la cercaire, alors qu'il est détectable en moins d'une heure après la transformation en schistosomule (Köster et Strand, 1994). De

plus, cette expression de Le^x, et non de sialyl Le^x (sLe^x), est **propre aux schistosomes** puisque Nyame *et al.* (1998) ont pu confirmer sa présence chez *S. haematobium* et *S. japonicum*, mais pas au niveau d'autres helminthes tels que le nématode *Fasciola hepatica* ou les nématodes *Dirofilaria immitis*, *Haemonchus contortus*, *Caenorhabditis elegans*.

3.3.1. Influence des anticorps anti-Le^x

Bien que le rôle des glycoconjugués dans le cycle et la survie du parasite ne soit pas clairement établi, différents éléments récents leur accordent une place essentielle. Ainsi les anticorps spécifiques, en particulier, de l'antigène Le^x pourraient avoir un **rôle dans l'immunité protectrice**:

- d'isotypes IgM ou IgG, ils sont détectés au niveau de sérums de souris vaccinées par des cercaires irradiées (Richter *et al.*, 1996), de singes rhésus ou de patients infectés par *S. mansoni* (Van Dam *et al.*, 1994; Srivatsan *et al.*, 1992; Ko *et al.*, 1990; Nyame *et al.*, 1996 et 1997).

- ils peuvent induire *in vitro*, en présence du complément, la cytolyse de leucocytes humains qui expriment cet antigène.

- ils peuvent également altérer la phagocytose des neutrophiles humains (Skubitz *et al.*, 1985), perturber les fonctions médiées par le C 3bi (Hickstein *et al.*, 1986) en interagissant probablement par l'intermédiaire des glycoprotéines présentes en surface tel que le LFA-1 (Skubitz et Snook, 1987), ou encore toucher l'activation des neutrophiles (Lund-Johansen *et al.*, 1992).

- mais, vis-à-vis de l'hôte, ils pourraient atténuer la réponse immunitaire en contribuant éventuellement à la **neutropénie** qui apparaît lors de la phase chronique de la schistosomiase: le CCA porte en effet des motifs répétés de Le^x (Van Dam *et al.*, 1994): qui induisent des titres importants d'anticorps IgM spécifiques. Ceux-ci réagissent alors avec les unités répétées de Le^x présentes à la surface des granulocytes et en présence du complément, ceci entraîne la lyse de ces granulocytes (Van Dam *et al.*, 1996).

- ces auto-anticorps pourraient avoir également une signification diagnostic, d'autant plus que le CCA contient ce trisaccharide.

3.3.2. Rôle direct de l'antigène Le^x

Une autre influence des glycanes du parasite contenant le Le^x serait d'agir directement sur le système immunitaire de l'animal infecté. On a pu en effet observer qu'ils étaient capables de stimuler des cellules B issues d'animaux infectés et d'induire la production d'IL-10 et des prostaglandines E2, molécules connues pour leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis d'une réponse de type Th1 (Vellupillai et Harn, 1994). De même, il est possible que d'autres oligosaccharides contenant du fucose, tels que les glycolipides de l'oeuf et le glycocalyx de la furcocercaire, puissent induire de telles réponses.

D'autre part, le rôle biologique des épitopes Lewis dans le phénomène d'adhérence est bien établi: les sélectines (protéines adhésives impliquées dans la réponse inflammatoire, l'hémostase ou encore la domiciliation des lymphocytes) reconnaissent sur leur cellules cibles des épitopes de nature glucidique dont la structure correspond à celle des antigènes Le^x (McEver *et al.*, 1995). Cependant on ne sait pas si cette interaction pourrait moduler l'adhésion cellulaire durant les stades précoces de la réponse inflammatoire, même si des séquences Lacdi Nac fucosylées, semblables à celles trouvées au niveau des glycanes de schistosome (Srivatsan *et al.*, 1992), sont capables d'interagir avec la E-sélectine et de bloquer la réponse médiée par celle-ci (Grinnell *et al.*, 1994). Trottein *et al.* (1997) suggèrent que l'hôte pourrait utiliser ce motif carbohydrate adhérent pour favoriser les **phénomènes de cytotoxicité**. Leurs résultats ont été confirmés *in vivo* de par l'existence de structure Le^x dans les produits d'excrétion-sécrétion du schistosomule et par la présence d'anticorps anti-Le^x détectés dans les sérums de rongeurs et de patients infectés. Ils pourraient avoir un effet inhibiteur sur les mécanismes d'ADCC.

3.4. La glycoprotéine de 38 kDa

3.4.1. Caractérisation

L'application de la technique d'hybridation cellulaire a permis la sélection d'un anticorps monoclonal anti-*S. mansoni* IgG2a, sécrété par une lignée cellulaire hybride résultant de la fusion de cellules myélomateuses avec des splénocytes de rats infectés. L'efficacité de cet anticorps monoclonal IgG2a dans les mécanismes de cytotoxicité *in vitro* suggérait une reconnaissance spécifique de la surface des schistosomules. De plus, ses fonctions protectrices *in vivo* laissaient supposer que l'on puisse isoler par des anticorps un antigène cible potentiellement protecteur contre l'infection par *S. mansoni* (Grzych *et al.*, 1982). En effet ces anticorps se sont révélés capables de précipiter sélectivement une glycoprotéine de surface du schistosomule, d'un poids moléculaire de 38 kDa (Dissous *et al.*, 1982). Caractérisée au stade de cercaire, cet antigène est totalement relargué de la surface du schistosomule en culture après 24 heures d'incubation, et n'est pas caractérisé au stade pulmonaire. Il est également présent au niveau des plaques ciliées du miracidium. L'apparition des anticorps anti-38 kDa dans le sérum de rat a lieu vers la 4^e semaine d'infection, période à laquelle l'animal devient immun à la réinfection (Thèse Dissous, 1984). Cependant, l'immunité disparaît vers la 10-12^e semaine, alors que les anticorps anti-38 kDa sont encore détectés dans le sérum des rats jusqu'à la 25^e semaine d'infection (Thèse Dissous, 1984). Dès lors les anticorps dirigés contre l'antigène 38 kDa n'étaient pas tous capables d'induire une activité cytotoxique ou protectrice! C'est ce que confirmait l'existence des anticorps monoclonaux IgG2c spécifiques de l'antigène de 38 kDa, précédemment évoqués en tant qu'anticorps bloquants, qui n'étaient ni cytotoxiques *in vitro*, ni protecteurs *in vivo*, mais qui pouvaient par contre inhiber les activités cytotoxiques et protectrices des anticorps IgG2a (Grzych *et al.*, 1984). Par conséquent, l'immunité de l'hôte pourrait être dépendante d'un mécanisme de régulation de la réponse humorale spécifique de l'antigène de 38 kDa, opérant au niveau de la synthèse préférentielle de certaines sous-classes d'IgG.

L'antigène de 38 kDa apparaît comme l'un des immunogènes majeurs des différents systèmes d'infection expérimentale (chez le rat, la souris ou le singe) et humaine (Dissous *et al.*, 1982). En effet, responsable de la production d'anticorps spécifiques chez 97% des sujets d'une population bilharzienne étudiée, il peut être considéré chez l'homme comme un marqueur de l'infection parasitaire.

Le rôle protecteur de l'épitope défini sur la glycoprotéine de 38 kDa par l'anticorps monoclonal d'isotype IgG2a a été vérifié par la production d'anticorps anti-idiotypiques mimant certains paramètres de l'infection par *S. mansoni*, mais cette approche sera développée dans un chapitre ultérieur.

3.4.2. Communauté antigénique avec la KLH

a) Caractérisation

Différents auteurs ont décrit la similarité antigénique existant entre les trématodes et leurs hôtes intermédiaires respectifs (Capron, 1965; Yoshino et Cheng, 1978 ; Yoshino et Bayne, 1983; Rivera-Marrero et Hillyer, 1985; Rasmussen *et al.*, 1985). Cependant cette identité antigénique ne résulterait non pas d'une adsorption de molécules du mollusque sur le parasite dans la mesure où, dans le cas de la glycoprotéine de 38 kDa, ces structures oligosaccharidiques existent sur le miracidium et plus tard dans les produits métaboliques du ver adulte. Mais elle résulterait plutôt d'une adaptation du parasite à son hôte et préviendrait ainsi d'une reconnaissance immune.

D'autre part, il a été décrit que des oligosaccharides de membrane pouvaient jouer un rôle essentiel dans l'adaptation osmotique de microorganismes (Miller *et al.*, 1986). Ceci laisse donc à penser que les modifications brusques d'osmolarité (notamment entre le stade larvaire aquatique et le stade schistosomule au niveau des tissus de l'hôte définitif) sont dépendantes de cet épitope glycanique porté par la glycoprotéine de 38 kDa hautement conservé au cours de l'évolution.

En effet, les travaux de Dissous *et al.* (1986) ont pu montrer que la structure oligosaccharidique portée par la glycoprotéine de 38 kDa possède des épitopes communs non seulement avec des extraits de mollusques d'eau douce, hôtes aux schistosomes tels que

B. glabrata pour *S. mansoni*, *Bulinus truncatus* pour *S. haematobium* ou encore *Lymnaea stagnalis* pour *Trichobilharzia ocellata* (schistosome aviaire) et comme non-hôte *Lymnaea limosa*; mais également avec l'hémocyanine du mollusque marin *Megathura crenulata* plus communément appelée KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) (Grzych *et al.*, 1987).

La KLH comprend 2 isoformes, l'un de 450 et l'autre de 392 kDa, respectivement appelé KLH-A et KLH-B, distincts par leur structure primaire et leur constante de liaison à l'oxygène. Très immunogène, la KLH peut induire, suite à une seule injection en intra-veineuse, une forte réponse anticorps pour 100% des vertébrés, y compris l'homme (Mattson *et al.*, 1974; Salvaggio *et al.*, 1969). Très largement utilisée dans des études humorales et cellulaires de la réponse immunitaire chez l'homme (Curtis *et al.*, 1970, 1972; Bird *et al.*, 1990), elle peut être une molécule porteuse pour un vaccin contre le SIDA (Khan *et al.*, 1992), un agent immunothérapeutique contre le cancer de la vessie (Flamm *et al.*, 1990; Jurincic *et al.*, 1988; Käble *et al.*, 1991; Winkler, 1996) ou encore un visée prophylactique (Bagasra *et al.*, 1992).

b) Importance de la KLH dans le diagnostic des schistosomioses

Les études de la réponse immunitaire dirigée contre les antigènes de surface de schistosome ont permis la mise en évidence de taux importants d'anticorps spécifiques de différents épitopes carbohydrates abondamment exprimés à la surface du schistosomule nouvellement formé. Ils sont détectables seulement pendant la phase aigüe mais pas pendant la phase chronique (Omer Ali *et al.*, 1989).

Ainsi la détection d'anticorps anti-KLH a été décrite comme moyen sérodiagnostic pour détecter la schistosomiase (Mansour *et al.*, 1989) et distinguer la phase aigüe de la maladie (Lambertucci *et al.*, 1993). La KLH présente l'énorme avantage d'être un glycoconjugué déjà disponible pour un test immunodiagnostic simple et peu coûteux. De nombreux exemples récents supportent sa très large utilisation : que ce soit pour diagnostiquer la schistosomiase humaine aigüe à *S. mansoni* chez des patients brésiliens (Alves Brito *et al.*, 1992; Lambertucci *et al.*, 1996), pour suivre l'effet de traitements au praziquantel ou à l'oxamniquine (Rabello *et al.*, 1997) ou encore pour détecter les infections humaines à *S. haematobium* en Tanzanie (Xue *et al.*, 1993) ou à *S. japonicum*

dans les régions endémiques de la Chine (Zheng *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1997). Il faut noter qu'aucune réaction n'a été mise en évidence avec Leishmanie, Trypanosome, Ascaris ou Ankylostome (Alves Brito *et al.*, 1992). Par contre, la KLH n'est pas utilisable pour le sérodiagnostic de la schistosomiase aigüe chez des voyageurs issus de zone non endémique (Verweij *et al.*, 1995). Récemment, Hamilton (SFI 1996) avançait l'argument suivant: l'efficacité de la KLH dans le diagnostic de la schistosomiase humaine à *S. mansoni* s'expliquerait par une réactivité croisée tout particulièrement avec des fractions de SEA, avec également dans ce cas, une possible implication des résidus glycaniques puisque ce sont des antigènes très glycosylés. En effet, la définition sérologique de la phase aigüe peut aussi être relativement établie sur la détection de taux importants d'anticorps spécifiques du SEA et particulièrement d'isotype IgA (Rabello *et al.*, 1995; Liping *et al.*, 1996).

c) KLH: effet protecteur et essais de vaccination

Il est important de noter que l'anticorps monoclonal IgG2a, tout comme d'autres anticorps contenus dans des sérums d'infection expérimentale, reconnaît différentes structures de la molécule KLH. D'autre part, l'identité structurale de l'épitope commun à la glycoprotéine de 38 kDa et la KLH se double d'une identité fonctionnelle, puisqu'en effet l'immunisation de rats par la KLH induit la production d'anticorps hautement cytotoxiques pour les schistosomules en présence d'éosinophiles. De plus, ces anticorps s'avèrent mais également protecteurs vis-à-vis d'une infection cercarienne d'épreuve par *S. mansoni*, lorsqu'ils sont transférés passivement (Grzych *et al.*, 1987).

D'autres auteurs (Mangold et Dean, 1992) ont rapporté la propriété protectrice d'anticorps anti-KLH de lapins immunisés avec des cercaires irradiées transférés passivement chez la souris.

De même, toujours dans le modèle murin, une immunisation passive d'anticorps monoclonaux spécifiques d'une glycoprotéine de 38kDa s'avère protectrice (Zodda et Phillips, 1982; Kelly *et al.*, 1986; Harn *et al.*, 1984 ; Harn, 1987) et démontrent ainsi que la souris peut-être protégée par immunisation d'antigène purifié par immunoaffinité à partir d'extraits d'œufs. Le tableau suivant rapporte les essais de vaccination avec la KLH contre différentes espèces de schistosomes, dans divers modèles expérimentaux.

Propriétés protectrices induites dans des expériences d'immunisation par la KLH vis-à-vis de différentes espèces de schistosomes.

Modèle	Parasite	Effets	Références
Rat	<i>S. mansoni</i>	diminution du nombre de vers adultes (de 50 à 76%)	(Grzych et al., 1987)
Bovin (Zébu)	<i>S. bovis</i>	diminution de la fécondité des vers (sans réduction du nombre de vers adultes)	(Bushara et al., 1993)
Mouton	<i>S. japonicum</i>	diminution du nombre de vers adultes (33,8%) et du nombre d'œufs fécaux et tissulaires (66,4%)	(Xu et al., 1995)

Les anticorps anti-idiotypes

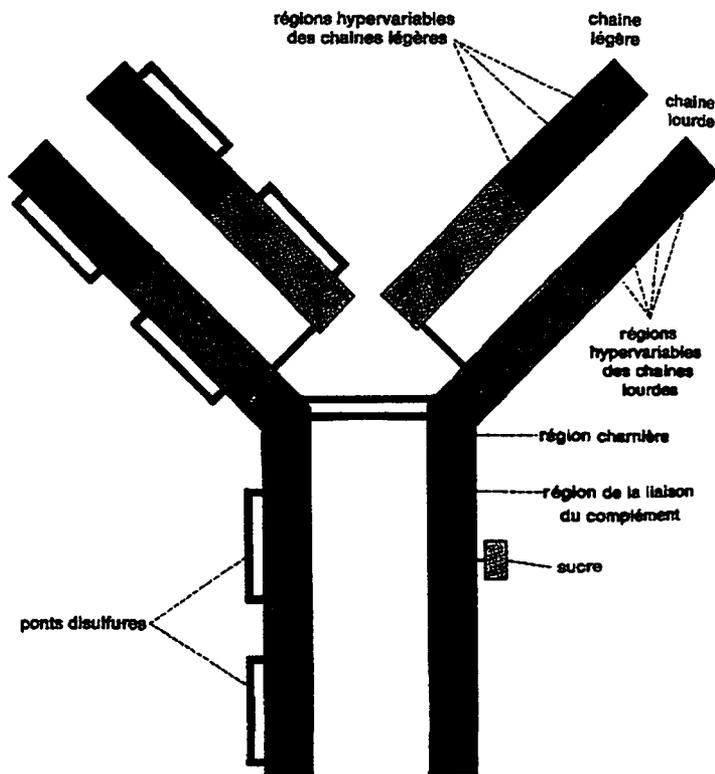
1. Structure et diversité des immunoglobulines

Les immunoglobulines, ou anticorps, sont des glycoprotéines impliquées dans la reconnaissance spécifique des antigènes. Présentes dans les liquides biologiques de tous les mammifères, certaines sont exprimées à la surface des cellules B où elles jouent le rôle de récepteurs spécifiques à l'antigène. D'autres, les anticorps, sont présents sous forme soluble dans le sang, la lymphe ou les muqueuses.

1.1. Structure des immunoglobulines

Caractérisées par leur diversité et leur extrême variabilité, ce sont cependant des molécules assemblées selon le même modèle: constituées de quatre chaînes polypeptidiques, comprenant deux chaînes dites légères L (pour "light") identiques et deux chaînes dites lourdes H (pour "heavy") identiques, elles forment ainsi une structure en Y flexible au niveau de la région charnière. Seuls les anticorps de chameau font exception et présentent uniquement une chaîne lourde (Hamers-Casterman *et al.*, 1993).

La représentation suivante n'est pas purement conventionnelle: elle a été observée directement au microscope électronique par Valentine en 1965. L'analyse biochimique a montré que chacune des quatre chaînes possède une région variable V côté amino-terminal qui contribue au site de liaison à l'antigène (fragment Fab), et une région constante C, qui dans le cas de la chaîne lourde détermine l'isotype, et par conséquent les propriétés fonctionnelles de l'anticorps, mais également les activités biologiques telles que la liaison du complément ou la fixation aux cellules du système immunitaire (fragment Fc).



Structure de base d'un anticorps de classe IgG humain.

Chaque chaîne comporte une région qui varie d'un anticorps à un autre (respectivement V_H et V_L) et une région qui reste constante à l'intérieur d'un type de chaîne lourde ou légère (respectivement C_H ou C_L). Les régions constantes des chaînes lourdes comprennent trois à quatre domaines de repliement indépendants, alors que celles des chaînes légères n'en comportent qu'un: ici dans ce cas particulier, la chaîne lourde est constituée dans l'ordre, de V_H , C_{H1} , C_{H2} et C_{H3} . Les régions variables comportent notamment des régions hypervariables (en rouge)

1.2. Diversité des immunoglobulines

Au sein de l'énorme diversité qu'offre les molécules d'anticorps, on peut définir les 3 niveaux principaux de variabilité suivants.

1.2.1. Les variations isotypiques

L'isotypie définit à l'intérieur de l'espèce, la variation des chaînes lourdes et légères dans leurs régions constantes. Ainsi par exemple, dans le génome humain, les gènes

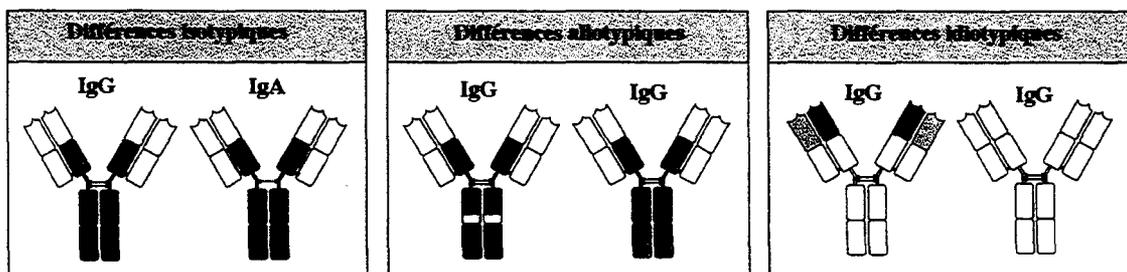
correspondant aux chaînes lourdes $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, μ , $\alpha 1$, $\alpha 2$, δ , ϵ et aux chaînes légères κ et λ , codent pour les différents isotypes.

1.2.2. Les variations allotypiques

Elles rendent compte des variations génétiques à l'intérieur d'une même espèce, et reflètent de la présence de différents allèles à un même locus. Ces déterminants allotypiques sont en général localisés dans les domaines constants des chaînes lourdes des immunoglobulines.

1.2.3. Les variations idiotypiques

Les modifications de la séquence en acides aminés observées dans les régions variables, et particulièrement dans les zones hypervariables, sont directement responsables de la spécificité du site de fixation à l'antigène, et déterminent ainsi les **idiotopes**. L'ensemble des idiotopes d'une partie variable constitue l'**idiotype** de l'anticorps. Généralement, l'idiotype est spécifique d'un seul clone cellulaire, donc présent sur les anticorps dirigés contre le même antigène; on parle alors d'idiotype privé. Mais parfois, différents clones cellulaires peuvent exprimer le même déterminant idiotypique que l'on retrouvera par conséquent systématiquement sur les immunoglobulines au cours d'une réponse immune; ceux-ci sont alors appelés idiotypes publics ou récurrents.



Variabilité des chaînes d'immunoglobulines

Les bases génétiques de la variabilité idiotypique reposent sur les faits suivants : d'une part les régions variables des chaînes légères (V_L) d'immunoglobulines sont codées par des segments génétiques V et J; d'autre part celles des chaînes lourdes (V_H) sont codées également par des segments génétiques V et J, mais en plus par le segment génétique D, qui apporte ainsi une diversité supplémentaire. La recombinaison d'un nombre limité de segments génétiques V, D et J, assure donc la diversité d'un très grand nombre de domaines variables. De plus, elle peut être accentuée par l'addition ou la délétion de nucléotides lors du réarrangement de ces gènes variables. Enfin, les chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines peuvent subir des modifications de structure au niveau des séquences codantes pour les régions variables, appelées mutations somatiques, après stimulation antigénique.

Ainsi cette diversité des molécules d'anticorps est étroitement liée aux gènes codant pour leurs chaînes polypeptidiques constitutives, mais elle résulte aussi tout simplement de la combinaison de n'importe quelle chaîne lourde avec n'importe quelle chaîne légère.

Toutes ces sources de diversité créent donc un vaste répertoire de spécificités des anticorps à partir d'un nombre relativement limité de gènes.

1.3. Notion de CDR et de régions "framework"

Wu et Kabat (1970) ont analysé les séquences d'acides aminés de nombreuses chaînes lourdes et légères. Pour disposer de source d'anticorps homogènes, ils ont utilisé des myélomes, tumeurs monoclonales de cellules B produisant un seul type d'immunoglobulines. Quand les régions variables des chaînes légères de différents myélomes ont été comparées, il est apparu que la variabilité dans la séquence d'acides aminés était concentrée sur trois régions hypervariables, d'approximativement 100 acides aminés de long, qui étaient encadrées par des résidus relativement invariants de la séquence de base, appelés "charpente". L'ensemble de ce motif, pour chaque région variable, est conservé d'un anticorps à l'autre. Les régions hypervariables sont les zones de contact avec l'antigène et

sont aussi appelées régions déterminant la complémentarité avec l'antigène, ou CDR pour "complementary-determining-regions".

La variabilité de la chaîne lourde est concentrée de la même façon en trois régions hypervariables avec un bruit de fond de variabilité moindre situé de chaque côté des CDR. Les séquences de base "charpente" de la partie variable des chaînes lourdes peuvent être divisées en groupes selon leur homologie et, dans quelques cas, selon l'identité des séquences. On considèrera ainsi par exemple le sous-groupe de variabilité ou la famille V_HIII des chaînes lourdes humaines.

De nombreux arguments montrent que les idiotopes situés sur les parties variables et hypervariables des immunoglobulines, sont liés au paratope (site de liaison à l'antigène) de l'immunoglobuline, bien que cette localisation ne soit pas exclusive.

2. L'idiotypie

2.1. Découverte de l'idiotypie

En 1963, les équipes de Kunkel et de Oudin ont observé presque simultanément la présence des idiotypes. Les travaux de Kunkel *et al.* portaient sur les anticorps humains spécifiques de déterminants antigéniques de globules rouges. Ceux de Oudin et Michel consistaient en la préparation d'anticorps anti-*Salmonella typhimurium* chez des lapins allotypiques : un lapin, préalablement saigné, a été immunisé avec des antigènes de *S. typhimurium* afin de produire des anticorps (Ab1 pour "antibody 1"). Ceux-ci ont été mis en contact avec l'antigène, puis réinjectés à un deuxième lapin qui a donc produit des anticorps Ab2 (anticorps anti-Ab1). Une partie de ces Ab2 était donc capable de reconnaître spécifiquement les anticorps Ab1 du premier lapin, mais aucune réaction n'était observée avec le sérum préimmun, ni avec celui d'autres lapins anti-salmonella. Ces anticorps Ab2 sont appelés **anticorps anti-idiotypes** puisqu'ils reconnaissent des idiotopes spécifiques, dus à la réponse anti-salmonella du premier lapin.

2.2. Bases structurales de l'expression de l'idiotypie

Différentes approches ont permis de caractériser la localisation et les bases structurales de l'expression de l'idiotypie d'une immunoglobuline.

2.2.1. Méthodes sérologiques

Elles comprennent des expériences de compétition de liaison à l'idiotypie par différents anticorps anti-idiotopes, par l'haptène ou l'antigène (Greenspan et Monafó, 1987). Les résultats de telles études démontrent qu'à la fois les régions variables V_H et V_L peuvent contribuer à l'expression de l'idiotope et suggèrent que de nombreux idiotopes sont localisés

effectivement à proximité du paratope. Il a été ainsi possible de construire une première carte grossière des multiples idiotopes exposés au niveau des régions variables d'un même anticorps (Greenspan et Davies, 1985; Zenke *et al.*, 1985). D'autre part, cette approche a permis de mettre en évidence des réactivités croisées parmi les familles des différents gènes des chaînes H et L (Chen *et al.*, 1991).

Combinée à des analyses de microscopie électronique, la sérologie a permis d'établir une cartographie tridimensionnelle de 4 idiotopes exprimés sur toute la surface d'une seule région variable, ou encore de démontrer la localisation des idiotopes sur la surface entière de la région variable, étendue du paratope jusqu'à la jonction avec le premier exon de la région constante (Roux *et al.*, 1987).

2.2.2. Corrélation avec la séquence en acides aminés

Les premières études ont pu simplement associer un ou plusieurs acides aminés avec un idiotope donné (Schilling *et al.*, 1980; Davie *et al.*, 1986). Puis l'utilisation de variants sans idiotope, sélectionnés *in vitro*, a permis d'établir une séquence en acides aminés corrélant avec des idiotopes particuliers définis par des anticorps monoclonaux (Radbruch *et al.*, 1985; Bruggemann *et al.*, 1986). Ces travaux ont permis de montrer que la substitution d'un seul acide aminé pouvait avoir des effets dramatiques sur l'expression de l'idiotope et que ces résidus d'acides aminés contribuant aux idiotopes pouvaient se situer dans les régions hypervariables comme dans les régions "charpente".

Plus récemment, la technique de mutagenèse dirigée a conduit aux constatations suivantes:

- la 3^e région hypervariable apparaît avoir une influence essentielle sur l'expression de l'idiotope mais toutes peuvent y contribuer;
- une mutation seule n'a pas d'effet sur l'expression de l'idiotope alors qu'introduite de façon concomitante avec d'autres mutations, elle a un effet potentiateur sur ces dernières (Hasemann et Capra, 1991; Hall *et al.*, 1992). Il y aurait ainsi des interactions coopératives entre les acides aminés impliqués.

Une approche alternative consiste à utiliser des peptides de synthèse correspondant à la séquence en acides aminés des domaines variables d'un anticorps donné, mais cette possibilité sera abordée plus loin.

2.3. Immunogénicité des idiotypes: induite ou spontanée

La possibilité d'induire des anticorps anti-idiotypes a été initialement démontrée par des modèles d'immunisations xénogéniques et allogéniques (Kunkel *et al.*, 1963; Oudin et Michel, 1963), dans un contexte syngénique (Bona *et al.*, 1979).

Les fluctuations entre les concentrations d'idiotypes et d'anti-idiotypes durant une réponse anticorps conventionnelle induite par des antigènes étrangers (Cosenza et Kohler, 1976; Bona *et al.*, 1978) ou durant la rémission de maladies autoimmunes (Sasaki *et al.*, 1988) suggèrent que les déterminants idiotypiques peuvent être spontanément immunogènes *in vivo*.

-Mécanismes d'immunogénicité des idiotypes. Rôle des cellules T

Quant aux mécanismes même d'induction d'une immunogénicité, on peut noter que les idiotypes sont des protéines à déterminants antigéniques, et que par conséquent la stimulation des cellules B produisant les anticorps anti-idiotypes nécessitent la coopération avec des cellules T. De nombreuses indications montrent que les cellules T sont capables de reconnaître les déterminants issus de molécules d'immunoglobulines. Mais puisque les cellules T ne peuvent pas reconnaître les déterminants des protéines natives, elles doivent vraisemblablement reconnaître des **idiopeptides** générés par l'apprêtement d'immunoglobulines dans le cytoplasme ou dans les vacuoles acides.

Récemment l'obtention de clones de lignées T CD4⁺ ou de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) a permis d'analyser les bases moléculaires de la reconnaissance des idiotypes par les cellules T (Waters et Bona, 1988; Wilson *et al.*, 1990). Ainsi les déterminants des régions variables seraient apprêtés et présentés comme des antigènes du

soi ou du non-soi. Ceci implique que les cellules T reconnaissent des idiopeptides en association avec des antigènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), et que les cellules T spécifiques d'idiotype CD4+ pourraient être stimulées par des immunoglobulines solubles desquelles l'idiopeptide serait généré à l'intérieur de vacuoles acides (Bogen *et al.*, 1985); alors que les cellules T spécifiques d'idiotype CD8+ reconnaîtraient l'idiopeptide généré par la voie endogène (Braciale et Braciale, 1992). Il est intéressant de noter que les anticorps anti-idiotypes n'inhibent pas la liaison au récepteur des cellules T (TCR) ou au CMH (Zaghouani *et al.*, 1992).

-Notion d'idiotype régulateur

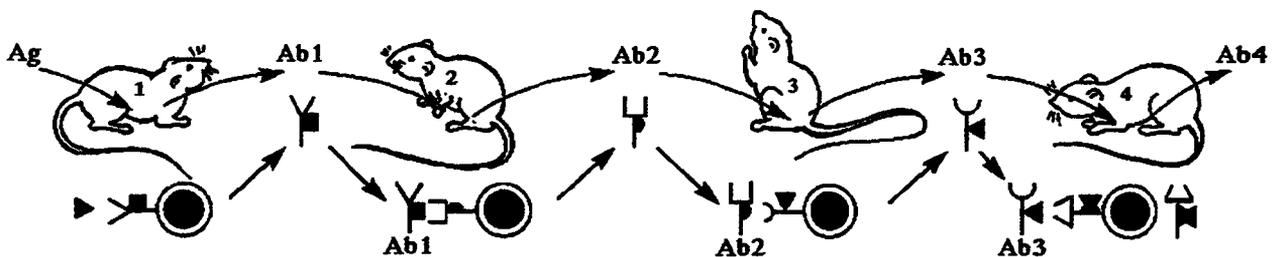
Définis par Bona *et al.* (1981), les idiotypes régulateurs sont trouvés de façon récurrente à différents niveaux de la cascade idiotypique, et ont donc une grande importance dans l'immunorégulation. Leur mise en évidence appuie d'ailleurs l'idée d'un réseau non infini (Urbain *et al.*, 1981). Ils présentent différentes propriétés:

- ils peuvent entrer en compétition avec l'antigène (Victor-Krobin *et al.*, 1987) et sont des marqueurs des gènes de la lignée germinale (Goldberg *et al.*, 1983; Victor-Krobin *et al.*, 1990).
- ils peuvent avoir la fonction d'autoimmunogènes puisqu'ils peuvent induire la synthèse d'anticorps autoidiotypiques (Victor-Krobin *et al.*, 1987).
- ils peuvent être portés par différents membres du réseau idiotypique (Ab1 et Ab3, ou Ab2 et Ab4) (Bona, 1981), mais également par des anticorps de différentes spécificités (Bonilla *et al.*, 1990; Zaghouani *et al.*, 1989).
- ils ont un potentiel dominant dans la mesure où ils sont reconnus par des cellules T (Rubinstein *et al.*, 1982).

3. Le réseau idiotypique

3.1. Théorie du réseau idiotypique: hypothèse de Jerne

En 1974, N.K. Jerne a postulé que la réponse immunitaire était régulée par un réseau d'anticorps idiotypiques et anti-idiotypiques. Les idiotypes étaient selon lui portés par des récepteurs de surface des lymphocytes B. La prolifération des lymphocytes B en réponse à un antigène engendre la production d'anticorps appelés Ab1. Chaque molécule d'anticorps Ab1 porte des déterminants idiotypiques qui lui sont propres, capables d'induire la production d'anticorps Ab2 qui les reconnaissent spécifiquement. Or les anticorps Ab2 peuvent à leur tour induire par leurs propres déterminants idiotypiques une réponse Ab3, qui elle-même induira une réponse Ab4 et ainsi de suite... C'est en fait cette production en cascade qui constitue le réseau idiotypique. Selon que les idiotopes sont situés à l'intérieur ou hors du paratope, les anticorps Abn seront différents parce que dirigés contre des idiotopes différents de la molécule d'anticorps Abn-1.



Le réseau idiotypique.

L'anticorps Ab1, spécifique d'un antigène donné, porte un motif moléculaire particulier appelé motif idiotypique (ici un carré). Une production d'anticorps Ab2 peut être induite contre l'idiotype porté par l'anticorps Ab1; puis une production d'anticorps Ab3 contre l'idiotype porté par l'Ab2, puis une production d'Ab4 et ainsi de suite... Il existe en fait plusieurs motifs idiotypiques par molécule d'anticorps et chez un même animal, ces différents types d'anticorps coexistent

Cette théorie fournissait enfin une explication sur l'homéostasie du système immunitaire, sur les mécanismes de communication entre les différentes cellules de ce système et sur le contrôle interne de la réponse immunitaire lors de l'introduction d'un antigène par exemple vaccinant. Afin d'illustrer la régulation interne intervenant dans l'établissement d'un réseau, prenons l'exemple d'un lymphocyte B, porteur à sa surface d'anticorps Ab1 spécifique d'un antigène X; en absence de l'antigène, les lymphocytes B porteurs à leur surface des anticorps anti-idiotypes Ab2 qui reconnaissent les Ab1, contrôlent la prolifération des lymphocytes porteurs d'Ab1 grâce à leur interaction avec les idiotypes de cet Ab1: ainsi les anticorps Ab1 ne sont pas sécrétés. L'introduction de l'antigène brise cet équilibre. Après bien des étapes, la réponse immunitaire qui suit l'immunisation se traduit par la prolifération de cellules capables de sécréter des Ab1. Les cellules anti-idiotypiques Ab2, "dépassées", répondent par leur propre prolifération. La production de nombreuses cellules porteuses d'Ab1 et de cellules porteuses de la mémoire immunitaire du contact avec l'antigène va donc établir un nouvel équilibre, différent du précédent. Ainsi l'amplification du nombre de clones Ab1 liée à l'introduction de l'antigène X peut induire un réseau local très complet dans lequel les cellules porteuses d'anticorps contre cet idiotype forment un mini-réseau caractéristique de l'antigène.

Depuis l'élaboration de cette théorie, différents éléments sont venus s'ajouter. Jerne limitait son axiome aux cellules B et à leurs produits. Or comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe concernant l'immunogénicité des idiotypes, il est maintenant clair que les cellules T participent au réseau. D'autre part, comme nous allons l'aborder dans le paragraphe suivant, l'effet des anticorps anti-idiotypes n'a pas été seulement démontré comme ayant des effets suppresseurs mais également des effets stimulateurs de la réponse immune. Enfin l'induction par l'Ab1 d'anticorps Ab2 de différentes natures ou spécificités étend les rôles et les utilisations potentielles du réseau idiotypique.

3.2. Rôle immunorégulateur du réseau idiotypique

De nombreux travaux expérimentaux ont permis de vérifier l'existence biologique du réseau idiotypique de Jerne et d'admettre les effets immunomodulateurs des interactions idiotypiques dans l'expression de l'immunité.

3.2.1. Effet suppresseur des anti-idiotypes sur les cellules B

Il réside dans la capacité qu'ont les anticorps à supprimer l'activité des clones portant l'idiotope correspondant.

Les travaux de Mage et Dray (1965) chez le lapin constituent la première mise en évidence d'une suppression, en l'occurrence de l'allotype. Décrit dans de nombreux systèmes expérimentaux, notamment chez la souris, ce phénomène peut être induit par une administration d'anticorps hétérologues ou homologues. Chez l'animal adulte, la suppression induite est temporaire alors que pendant la période néonatale elle peut être de longue durée, mais dans les 2 cas l'idiotope étudié n'est plus exprimé (Kim, 1979). Des expériences similaires ont été réalisées *in vitro* par Cosenza et Kohler (1972) dans ce même modèle; puis elles ont été étendues à une suppression *in vivo* par Strayer *et al.* (1975).

La notion de dose d'anticorps anti-idiotypes administrés a son importance. En effet, une petite quantité d'anticorps anti-idiotypes est suffisante chez le nouveau-né pour obtenir une suppression de l'expression de l'idiotope, alors que chez les souris adultes, une injection d'importante quantité d'anti-idiotype est nécessaire pour obtenir les mêmes effets de façon transitoire.

-Mécanismes de suppression

Une suppression définitive peut être obtenue suite à un traitement prolongé par des anticorps anti-idiotypes chez des souris immunisées contre un haptène de phénylarsionate (Ar) (Hart *et al.*, 1972; Pawlak *et al.*, 1973). Un mécanisme probable de cette suppression à long terme serait que les anti-idiotypes bloquent les immunoglobulines sur les cellules B primaires permettant une stimulation sélective des cellules spécifiques de l'antigène Ar, mais

pas d'idiotype précis (Id). Ensuite les cellules B secondaires exprimant des anticorps anti-Ar Id, domineraient la réponse indéfiniment.

Un autre mécanisme de suppression consisterait à induire des cellules T spécifiques de l'idiotype, en réponse au traitement par les anti-idiotypes. C'est ce qu'ont pu démontrer Eichmann et Rajewsky (1974) en ce qui concerne un idiotype associé aux anticorps anti-streptocoque.

D'autre part, dans le cas de la réponse immunitaire spécifique de la protéine basique de myéline humaine (MBP), l'altération portée dans la production d'anticorps par les cellules sécrétant l'idiotype se fait sans phénomène de cytotoxicité (Zhou *et al.*, 1990). Les études de Hart *et al.* (1972) révélaient quant à elles, que seuls les anticorps anti-idiotypes natifs induisaient un effet suppresseur, à l'inverse de leur fragment Fab ou (Fab₂), ce qui suggérait de ce fait la participation des fragments Fc pouvant agir par le biais du complément.

3.2.2. Activation d'une réponse immunitaire

Dans le cas de l'antigène polysaccharidique de streptocoque, des anticorps spécifiques d'un idiotope public (A5A) peuvent moduler la production d'anticorps portant cet idiotope. Cependant, selon l'isotype de ces anticorps anti-idiotypes, les effets peuvent être opposés: l'isotype IgG1 stimule le clone porteur de l'idiotope A5A et donc la production d'anticorps portant l'idiotope A5A, qui représente alors une forte proportion de la réponse anti-streptocoque; au contraire, l'isotype IgG2 induit une suppression de l'idiotope A5A sans affecter la réponse globale (Eichmann et Rajewsky, 1975).

D'autre part, les expériences de Trenkner et Riblet (1975) et de Kelsoe *et al.* (1981) soulignent là encore l'importance de la dose utilisée d'anticorps anti-idiotypes: l'injection de forte quantité d'anti-idiotypes conduit à la suppression idiotypique, alors que l'injection de faible quantité augmente l'expression de l'idiotype spécifique. Ces quantités sont équivalentes aux quantités d'idiotypes trouvées naturellement dans le sérum. Ainsi des anticorps anti-idiotypes capables de moduler ces réponses seraient produits naturellement *in vivo* au cours de la réponse immunitaire.

Quant aux mécanismes propres d'activation, les résultats de Victor *et al.* (1983) nient la possibilité de propriétés stimulatrices polyclonales "mitogène-like" des anticorps anti-idiotypes.

3.2.3. Rôle du réseau idiotypique dans l'établissement du répertoire des cellules B

Différents éléments supportent le fait que les interactions idiotypiques, chez un animal nouveau-né, jouent un rôle dans l'établissement du répertoire des cellules B chez l'adulte (Kearney *et al.*, 1989; Victor *et al.*, 1983). Le groupe de Kearney et d'autres (Holmberg *et al.*, 1984) ont montré que les immunoglobulines M de souris périnatales, et non pas celles de souris adultes, ont une incidence sur les anticorps autoréactifs, notamment les anticorps spécifiques d'idiotopes portés par les molécules d'immunoglobulines autologues. Les perturbations périnatales de tels idiotopes, causées par l'administration d'idiotypes ou d'anti-idiotypes autologues, peuvent avoir des effets importants sur l'expression à l'âge adulte de ces derniers.

Augustin *et al.* (1983) conforte l'idée que les anticorps anti-idiotypes particuliers portant la copie des déterminants antigéniques sont des structures essentielles qui peuvent ainsi médier les interactions cellulaires conduisant à la sélection et à la conservation des répertoires des cellules B mais également des lymphocytes T.

D'autre part, les idiotypes de la mère peuvent avoir à leur tour de fortes propriétés immunorégulatrices vis-à-vis de l'établissement du répertoire de sa progéniture (Wikler *et al.*, 1980).

4. Les anticorps anti-idiotypes :

notion d'image interne

4.1. Hétérogénéité des anticorps anti-idiotypes

Les différentes localisations possibles des idiotopes au niveau des différents segments des régions variables soulignent l'hétérogénéité des anticorps anti-idiotypes induits. Basés sur ces observations, Jerne *et al.* (1982), puis Bona et Köhler (1984) ont défini 4 catégories d'anticorps anti-idiotypes (Ab2):

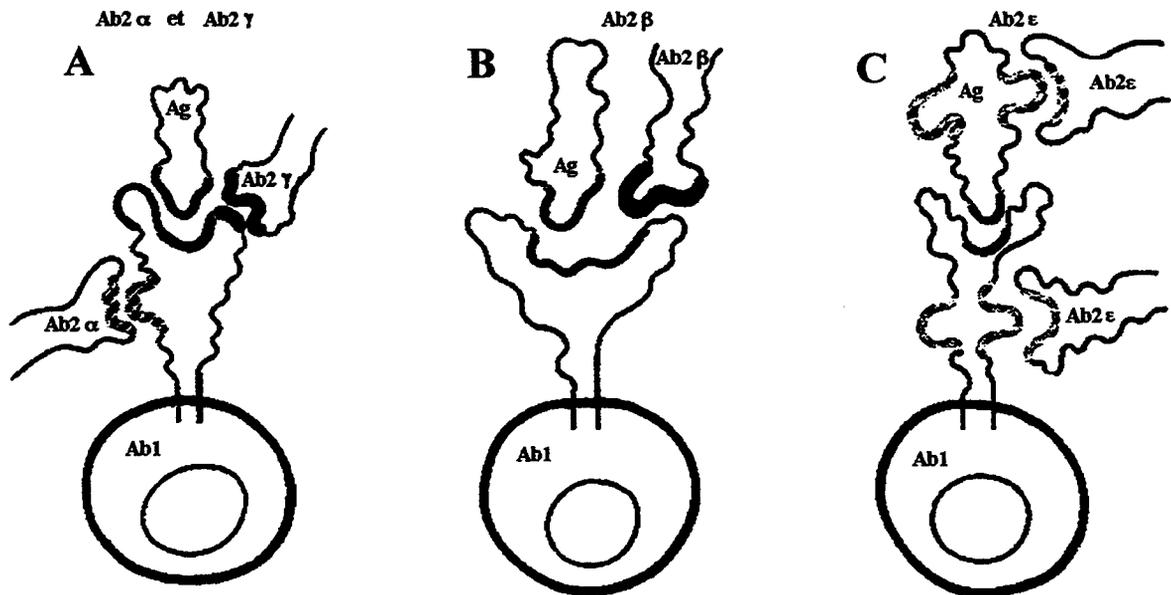
- *les anti-idiotypes Ab2 α* : ils reconnaissent des idiotypes associés aux séquences "charpente" des régions variables, ainsi leur liaison aux idiotopes correspondants n'est pas inhibée par l'antigène. Inoculés en grande ou en petite quantité, ces anticorps anti-idiotypes peuvent respectivement supprimer ou stimuler les clones exprimant l'idiotype, mais ils ne peuvent pas mimer l'antigène. Huang *et al.* (1986) ont montré que les Ab2 α pouvaient induire une prolifération T-dépendante et restreinte par le CMH des cellules B, ainsi que leur différenciation en cellules productrices d'anticorps. Il a été également montré que les Ab2 α dirigés contre des anticorps spécifiques d'un antigène donné, pouvaient induire des anticorps spécifiques sans contact au préalable avec l'antigène (Schick *et al.*, 1987; Mayer *et al.*, 1987). D'autre part, ils expriment des idiotypes (conventionnels ou régulateurs) appartenant aux Ab1 puisque les anticorps induits par leur immunisation sont capables d'inhiber les réactions idiotypiques-anti-idiotypiques.

- *les anti-idiotypes Ab2 γ* : ils reconnaissent le paratope associé aux idiotopes. De tels anticorps anti-idiotypes inhibent donc la liaison à l'antigène: cette inhibition est de nature stérique ou due à une modification conformationnelle du paratope (Bona et Kohler, 1984). Tout comme les Ab2 α , ils ne peuvent pas mimer l'antigène. Une catégorie particulière d'Ab2 γ interagit avec des idiotopes régulateurs précédemment définis.

- les anti-idiotypes $Ab2\beta$: ils reconnaissent les idiotopes qui miment l'antigène. Ces anticorps portent l'image interne de l'antigène. Ainsi leurs idiotypes présentent des réactions croisées avec les épitopes du soi et du non-soi. Similaires mais pas identiques, ils sont capables de mimer la structure tridimensionnelle des épitopes, donc d'inhiber la liaison de l'Ab1 à l'épitope.

- les anti-idiotypes $Ab2\varepsilon$ (ou "epibodies"): ils représentent une catégorie particulière d'anticorps anti-idiotypes qui reconnaissent les idiotopes communs à l'antigène et aux anticorps dirigés contre cet antigène (Bona *et al.*, 1982 et 1986). Ils ont été décrits parmi

les anticorps anti-idiotypes spécifiques d'idiotypes d'autoanticorps (Dwyer *et al.*, 1986; Puccetti *et al.*, 1990) et d'anticorps anti-allotype (Bona et Kohler, 1984). L'Ab2 ε peut représenter une catégorie particulière d'image interne car son paratope interagit avec à la fois l'idiotope et l'épitope.



Les anticorps anti-idiotypes.

Sur cette molécule d'anticorps pourvue d'un site de reconnaissance en couleur, trois déterminants idiotypiques figurent en gris hachuré, noir et bleu hachuré. L'antigène est reconnu par le site de localisation du motif idiotypique (couleur en A). Les différents types d'anticorps anti-idiotypiques dépendent en fait déjà de la localisation du motif idiotypique.

En A, les Ab2 α et Ab2 γ (régulateurs) se fixent sur des motifs plus ou moins proches du site de combinaison de Ab1. En B, un anticorps Ab2 β reconnaît un motif localisé à l'intérieur, voire très proche, du site de combinaison: dans ce cas son site de reconnaissance peut mimer le déterminant antigénique reconnu par Ab1. En C, les Ab2 ε reconnaissent une toute autre classe de motifs antigéniques: leur site de combinaison reconnaît aussi bien un motif antigénique de l'Ab1 qu'un motif antigénique de l'antigène reconnu par Ab1, d'où leur implication dans les maladies auto-immunes.

Ces trois grandes classes d'anticorps anti-idiotypiques représentent en même temps trois grandes classes d'activités immunologiques: régulation, images internes et auto-immunité.

Cette classification simplifie les propriétés immunochimiques et fonctionnelles des anticorps anti-idiotypes, mais elle met en évidence la complexité et la diversité des anticorps anti-idiotypes.

4.2. De la notion d'image interne au concept d'antigène de substitution

Nisonoff et Lamoyi (1981) ou encore Roitt *et al.* (1981) ont été les premiers à proposer l'utilisation des Ab2 β en tant que vaccins potentiels. Depuis, les immunoglobulines images internes ont été largement utilisées dans des domaines aussi variés que l'endocrinologie, la cancérologie, l'autoimmunité, la transplantation d'organe ou le diagnostic, applications que nous évoquerons dans le paragraphe suivant; mais au vue de tels intérêts, Ertl et Bona (1988) ont proposé différents critères précis pour définir les anticorps images internes.

4.2.1. Critères définissant les Ab2 β

- critère immunochimique : la capacité des Ab2 β inhibant la liaison à l'antigène par interaction avec l'idiotype associé au paratope est utilisée pour distinguer les Ab2 β des Ab2 γ .

- critère fonctionnel : il est basé sur la capacité des Ab2 β à mimer un antigène donné et ainsi à induire la synthèse d'anticorps spécifiques pour un antigène du soi ou étranger. Bien que les Ab2 α ou les Ab2 γ puissent activer les clones exprimant les idiotypes correspondants, cette activation survient de manière différente de celle induite par les Ab2 β . Une particularité des Ab2 β réside dans leur capacité à stimuler, en lieu et place de l'antigène, des clones cellulaires dans différentes espèces (Reale *et al.*, 1986) : en effet, la spécificité vis-à-vis du même antigène peut être codée par différents gènes V_H et V_L dans

différentes espèces. Ceci peut être illustré par les travaux de Francotte et Urbain (1984) dans le cas du virus de la mosaïque du tabac où un "bon" Ab 2β dans une espèce donnée, peut reconnaître un idiotype régulateur dans une autre espèce. Ce critère peut donc avoir des conséquences pratiques dans l'élaboration de vaccin.

- critère structural : l'identité structurale entre l'épitope d'un antigène et un segment de région variable de l'anticorps représente le critère le plus approprié pour définir un anticorps Ab 2β . L'idiotype d'un Ab 2β étant identique à l'épitope de l'antigène, il interagira avec le récepteur à l'antigène du lymphocyte comme l'antigène lui-même.

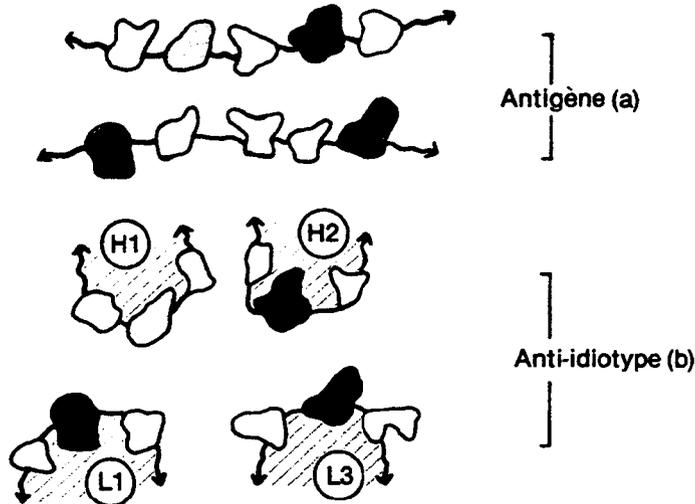
Alors que le critère structural peut être le meilleur paramètre pour la définition d'Ab 2β issus d'immunisation par des anticorps spécifiques d'antigènes protéiques, les critères immunochimiques et fonctionnels peuvent être utilisés pour définir les Ab 2β issus d'anticorps spécifiques de polysaccharides, lipoprotéines, nucléotides, stéroïdes ou drogues synthétiques; d'autant plus que ces moyens de sélection des Ab 2β restent plus accessibles que les techniques complexes et onéreuses nécessaires à la définition de la structure dans l'espace de l'antigène et de l'idiotype qui lui correspond.

4.2.2. Bases moléculaires et structurales de l'imagerie interne

- *résidus de contact*

Roitt *et al.* (1985) ont défini plusieurs cas où l'interaction entre l'anticorps anti-idiotype et l'antigène se concrétise par la présence de résidus de contact, encore récemment rapportés par les travaux de Bentley *et al.* (1990) sur la structure tridimensionnelle du complexe idiotype-anti-idiotype. Plus les points de contact entre l'anticorps et l'antigène sont nombreux, plus la liaison est forte. Ces liaisons multiples sont facilitées par la structure en sillon du site de fixation de l'anticorps. Les résidus de contact peuvent se trouver éloignés les uns des autres, voire même sur des chaînes peptidiques différentes : par exemple, si les points de contact sur un antigène se font par l'intermédiaire de 4 résidus de l'épitope, ces mêmes résidus placés de la même manière sur les différentes chaînes de l'Ab 2

suffisent à mimer l'antigène. Il n'y a donc pas d'identité parfaite entre l'Ab 2β et l'antigène, mais bien une similitude au niveau des sites de contact.



Les anticorps anti-idiotypes peuvent ressembler aux antigènes puisque les résidus d'acide aminés qui sont en contact avec l'idiotype (en couleur), sont les répliques des mêmes résidus dans l'antigène.

Dans le cas de la production d'anticorps anti-idiotypique contre des molécules de petites tailles (Cleveland *et al.*, 1983; Schreiber *et al.*, 1980), Roitt *et al.* (1985) proposent que cette conformité au niveau des sites de contact s'effectue avec des acides aminés dominants.

- homologie de séquence

Il a été démontré que des Ab 2β portent une homologie de séquence au niveau d'une de ses zones hypervariables avec l'antigène, lorsqu'il est de nature protéique (Roth *et al.*, 1985; Schiff *et al.*, 1986). Bruck *et al.* (1986) rapporte qu'un térapeptide est porté par un épitope de l'hémagglutinine de réovirus et le CDR2 de la chaîne légère d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique. De plus, une modélisation informatique a permis de conforter l'idée qu'une homologie de séquence pouvait expliquer l'imagerie interne dans le système réovirus.

D'autre part, les analyses de séquence des gènes V_H et V_L de 2 anticorps monoclonaux obtenus à partir de souris immunisées avec des immunoglobulines de lapin

portant l'allotype 1a, montrent une identité entre cet allotype et les séquences pour ces 2 anticorps anti-idiotypes, localisées au niveau du segment V_H, mais cette fois en orientation inversée (Van Cleave *et al.*, 1988).

Cependant deux contre-exemples montrent qu'une identité conformationnelle peut être obtenue avec des séquences en acides aminés très différentes. Les études menées par Akolker *et al.* (1987) révèlent que la séquence primaire ne détermine pas la spécificité ni la fonction d'anticorps spécifiques de l' $\alpha(1\rightarrow6)$ -dextran, puisque différentes séquences en acides aminés localisées au niveau des 3 CDR ne perturbent pas la spécificité de ces anticorps vis-à-vis de l'antigène. D'autre part, une même activité biologique reposant sur une conformation protéique similaire peut être remplie par des séquences primaires entièrement différentes : l'étude des familles d'hémoglobulines et de myoglobines dans diverses espèces illustre bien ce cas de figure (Dickerson, 1983). Ainsi une identité de fonction ne nécessite pas forcément une identité de séquence. La nature ne sélectionne donc pas selon les séquences primaires, mais plutôt selon les conformations fonctionnelles.

-Identité conformationnelle

Donc, en contradiction avec l'interaction « clé-serrure » existant entre les antigènes et leurs anticorps spécifiques, l'interaction entre les idiotypes et leurs anticorps apparaît essentiellement basée sur une mimicrie tridimensionnelle, sorte de clé-serrure dégénérée. Ainsi l'antigène et l'épitope anti-idiotypique, qui peuvent être très différents dans leur structure chimique primaire, sont reconnus comme similaires par le même anticorps.

Les études cristallographiques de Fields *et al.* (1995) ou de Ban *et al.* (1994) démontrent que la mimicrie structurale implique des forces de van der Waals et des ponts hydrogène: il est donc nécessaire d'avoir des liaisons similaires plutôt qu'une réplique topologique exacte, impossible à atteindre dans la plupart des cas. Ainsi, la mimicrie de polysaccharides par des Ab2 β , illustrée pour la première fois par les travaux de Rubinstein *et al.* (1985), ne peut pas être due à une homologie de séquence de l'antigène et de l'Ab2 β , mais plutôt au fait qu'ils portent des groupements chimiques fonctionnels qui interagissent avec le site de liaison de l'anticorps anti-polysaccharide.

4.3. Applications des anticorps anti-idiotypes

Rarement en science, un concept théorique voit apparaître de rapides applications pratiques. Ce fut pourtant le cas du concept de l'image interne, considérée en terme de copie topologique ou empreinte positive des épitopes antigéniques. La première évidence expérimentale supportant le concept d'une mimicrie possible des propriétés biologiques d'un antigène par des anticorps anti-idiotypes, a été avancée par Sege et Paterson (1978). Ils ont montré que des anticorps anti-idiotypes produits à partir d'anticorps spécifiques de l'insuline étaient capables de se lier au récepteur de l'insuline et de mimer les fonctions de cette hormone. Dès lors, on a pu considérer les Ab 2β comme de véritables antigènes de substitution.

Le tableau ci-dessous rassemble les différents systèmes expérimentaux dans lesquels la mimicrie anti-idiotypique a été étudiée.

Antigènes	Réponses
A. Hormones	
	Récepteurs
Insuline	Récepteur à insuline (Sege, 1978)
Gonadotropine	Récepteur à gonadotropine (Moyle, 1982)
Aldostérone	Protéine liant l'aldostérone (Lombes, 1989)
TSH	Récepteur à TSH (Braun, 1993)
Thyrotrophine	Récepteur à thyrotrophine (Wang, 1994)
B. Ligands biologiquement actifs	
	Récepteurs
Formyl peptide	Récepteur chimiotactique (Marasco, 1982)
Laminine	Récepteur B à laminine (Lassoued, 1991)
Facteur H	Récepteur à globuline- β 1H (Lambris, 1982)
Bradykinine	Récepteur à Kinine (Hasserman, 1991)
β -Glycane	Récepteur à β -Glycane de monocytes (Czop, 1990)
Albumine	Récepteur à albumine de cellules endothéliales (Dobriła, 1992)
Albumine polymérique	Récepteur à albumine polymérique humaine du virus de l'hépatite B (Colucci, 1987)
TNF α	Récepteur à TNF (Galloway, 1992)
C. Drogues d'origine organique	
	Récepteurs
BisQ	Récepteur à acétylcholine (Cleveland, 1983)
Alprénolol	Récepteur β -adrénergique (Schreiber, 1980)
Morphine	Récepteur à opiacés (Glasel, 1985)
Adénosine	Récepteur à adénosine (Ku, 1987)
Cyclosporine	Cyclophiline (Cacalano, 1987)
D. Protéines diverses	
	Spécificité de la réponse
HLA-DR	Antigènes HLA (Perosa, 1989)
IgE	Dégranulation de basophiles (Baniyash, 1987)
IgE	Facteur liant l'IgE (Sarafati, 1981)
Protéine de transport de la vitamine A	Liaison à la pré-albumine (Sege, 1978)
Collagène de type II	Epitope arthritogénique (Nordling, 1991)
Facteur rhumatoïde	Protéine du HSV de type I liant le Fc γ (Tsuchiya, 1990)
Fragment Fc	Récepteur RF de cellules B (Fong, 1984)
Taxol	Tubuline-microtubule (Leu, 1994)
E. Toxines	
	Type de réponse
Toxine diphthérique	Protection de cellules Vero contre un effet cytotoxique (Rolf, 1989)
Toxine Killer de <i>Pichia anomala</i>	Protection <i>in vivo</i> contre <i>Candida albicans</i> (Polonelli, 1996)
Ricine	Protection <i>in vivo</i> (Chanh, 1995)
F. Bactéries	
	Type de réponse
<i>C. levanicum</i>	Anticorps anti- β 2-6 fructosane (Rubinstein, 1985)
<i>E. coli</i>	Anticorps protecteurs anti-polysaccharide capsulaire (Stein, 1984)
<i>S. pneumonia</i>	Immunité protectrice (McNamara, 1985)
<i>S. pyogenes</i>	Anticorps protecteurs anti-carbohydre du groupe A (Monafó, 1987)
<i>L. pneumonia</i>	Anticorps non-neutralisants anti-cytolisine (Spitsin, 1991)
<i>P. aeruginosa</i>	Anticorps protecteurs anti-antigène capsulaire (Schreiber, 1994)
Lipide A	Anticorps protecteurs (Su, 1992)
Phosphocholine	Anticorps anti-phosphocholine (McNamara, 1985)

Antigènes	Réponses
G. Virus	
	Type de réponse
Réovirus de type 3	Anticorps neutralisants (Gaulton, 1986)
Hépatite B	Anticorps protecteurs chez le chimpanzé (Kennedy, 1986)
HIV	Anticorps neutralisants anti-gp120 (Zaghouani, 1991)
	Anticorps non neutralisants anti-p24 (Hohmann, 1993)
Poliovirus de type II	Anticorps neutralisants (Uytdehaag, 1985)
Herpes simplex type II	Augmentation de la pathogénicité chez la souris (Kennedy, 1984)
Virus de la rage	Anticorps neutralisants (Regan, 1983)
Virus Sendaï	Immunité protectrice (Ertl, 1984)
Virus Influenza	Anticorps neutralisants anti-hémagglutinine (Anders, 1989)
SV40	Anticorps suppresseurs anti-antigène T du SV40 (Kennedy, 1985)
Corona virus	Anticorps anti-épitope A59-MHV (Lamarre, 1991)
Virus de la langue bleue	Anticorps neutralisants (Grieder, 1990)
FMDV	Anticorps non neutralisants (Baxt, 1989)
Virus coxsackie B4	Anticorps non neutralisants (McClintock, 1986)
Virus de la mosaïque du tabac	? (Francotte, 1984)
H. Parasites	
	Type de réponse
<i>Schistosoma mansoni</i>	Anticorps cytotoxiques et protecteurs anti-glycoprotéine de 38kDa (Grzych, 1989)
	Anticorps anti-glycoprotéine de 68kDa (Kresina, 1989)
Trypanosomes	Immunité protectrice anti-VAT (Sachs, 1984)
Trichothécène	Anticorps protecteurs anti-mycotoxine T2 (Chanh, 1990)
I. Antigènes du soi	
	Maladies associées
I.a. Auto-antigènes	
S-antigène	Uvéorétinisme (De Kojak, 1990)
Convertase C3/C5	Prolifération de la membrane glomérulonéphritique (Sptizer, 1992)
Facteur VIII	Hémophilie A (Lubhan, 1990)
CD4	Séropositivité HIV-1 associée à une thrombocytopenie (Karpatkin, 1992)
I.b. Antigènes associés aux tumeurs	
GD2	Mélanome (Salek, 1993)
Antigène de mélanome de haut PM	Mélanome (Chen, 1993)
gp37	Leucémie des cellules T humaines (Buattacharya-Chatterjee, 1988)
Antigène de carcinome du colon	Cancer du colon (Herlyn, 1987)
Antigène de tumeur mammaire humaine	Tumeur du sein (Smorodinsky, 1988)
gp52 de la tumeur mammaire murine	Cancer du sein (Raychandhuri, 1987)
Antigène tumoral SV40	Tumeur chez la souris (Shearer, 1990)
Tumeur L1210	Leucémie murine (Saeki, 1983)

4.3.1 Domaines divers d'applications

La démonstration de la capacité des Ab2 β à mimer des fonctions de l'insuline a suggéré que les Ab2 β pouvaient mimer des ligands biologiquement actifs. Ainsi Wang *et al.* (1994) ont montré qu'un anticorps anti-idiotype spécifique de l'anticorps anti-hormone de croissance porcine était capable de stimuler la croissance d'animaux hypophysectomisés déficients en hormone somatotrope. La partie A du tableau illustre les hormones mimées par des immunoglobulines images internes. Il a ainsi été rapporté que les Ab2 β préparés à partir d'anticorps anti-hormone pouvaient mimer complètement, ou du moins partiellement, les événements intracellulaires biochimiques et/ou moléculaires induits suite à la liaison des hormones à leur récepteur cellulaire correspondant. Ainsi ces anticorps Ab2 β peuvent également mimer la liaison à des récepteurs d'autres ligands biologiquement actifs, tels que ceux cités en partie B du tableau: ces exemples montrent la possibilité d'obtenir des immunoglobulines images internes par un ligand spécifique d'un récepteur en absence du récepteur lui-même.

Des drogues d'origine organique (partie C), diverses protéines ou du moins leurs déterminants antigéniques (partie D) peuvent aussi être mimées par des Ab2 β .

Une application particulièrement intéressante concerne les anticorps anti-idiotypes mimant l'activité anti-microbienne de toxine "killer", comme celle de *Pichia anomala*. La propriété anti-microbienne de ces immunoglobulines, aussi efficaces que des antibiotiques *in vitro* et *in vivo* par vaccination idiotypique chez la souris, leur a valu la dénomination "d'antibiododies" par Polonelli *et al.* (1991 et 1993). Des anticorps de type sécrétoire ont même été induits par vaccination idiotypique intravaginale chez le rat, leur conférant une protection vis-à-vis d'une infection par *Candida albicans* (Polonelli *et al.*, 1994). Enfin, la relevance de l'existence d'un tel réseau idiotypique au niveau local dans ce système a été confirmée chez l'homme par Polonelli *et al.* (1996).

4.3.2. Image interne d'épitopes bactériens et viraux

Différents systèmes expérimentaux ont montré la possibilité d'induire chez l'animal une immunité anti-bactérienne ou anti-virale, à l'aide d'anticorps anti-idiotype (parties F et G du tableau I).

Les antigènes bactériens mimés peuvent être aussi bien de nature protéique que polysaccharidique. Les travaux de Stein *et al.* (1984) ont montré chez la souris que l'injection néonatale d'anticorps anti-idiotypiques spécifiques sensibilise l'animal vis-à-vis d'*Escherichia coli* de type K13. Ce traitement conduit à une production intense et précoce d'anticorps anti-*E. coli*, phénomène qui pallie à la faible immunogénicité des sucres chez de jeunes animaux. Ainsi Rubinstein *et al.* (1985) sont à l'origine de l'une des premières démonstrations directes de la mimicrie d'un antigène polysaccharidique par des Ab2 β .

D'autres auteurs ont utilisé les anticorps anti-idiotypes pour stimuler une réponse humorale et cellulaire vis-à-vis d'antigène viraux. Kennedy *et al.* (1983) démontrent que l'injection d'anti-idiotype induit une réponse anticorps spécifiques des antigènes de surface du virus de l'hépatite B et qu'un idiotype ciblé était partagé par tous les anticorps anti-hépatite B produits dans différentes espèces (Kennedy et Dressman, 1984). Une immunité protectrice peut être induite chez le chimpanzé par vaccination anti-idiotypique (Kennedy *et al.*, 1986; Thanalava et Roitt, 1986), ce qui pourrait avoir une application future chez l'homme dans la protection des nouveaux-nés et des sujets immunodéprimés. De même, l'immunisation par des anticorps anti-idiotypes peut induire des anticorps dirigés contre des protéines de l'enveloppe d'HIV-1 (Zaghouani *et al.*, 1991), anticorps capables de neutraliser le virus chez le singe (Kang *et al.*, 1992).

4.3.3. Images internes d'épitopes parasitaires

Les vaccins anti-idiotypiques contre les parasites présentent l'avantage de pouvoir être produit en masse à moindre coût, contrairement aux vaccins basés sur un antigène qui nécessite une étape d'extraction à partir d'un stade donné du parasite. Sacks *et al.* (1982)

ont réussi les premiers à protéger des souris infectées par *Trypanosoma rhodensiense* à l'aide d'anticorps anti-idiotypes.

Des travaux similaires effectués pour le parasite *S. mansoni*, utilisant des anticorps anti-idiotypes de lapin (Kresina et Olds, 1989) et de rat (Grzych *et al.*, 1985; Velge-Roussel *et al.*, 1989) ont démontré la réalité du concept d'image interne. Cette dernière étude réalisée chez le rat, utilise un anticorps monoclonal Ab1 murin d'isotype IgE pour stimuler des anticorps polyclonaux Ab2, qui induisent à leur tour des Ab3 à la fois d'isotype IgE et IgG, cytotoxiques vis-à-vis du schistosomule en présence d'éosinophiles, macrophages ou plaquettes. Ces résultats, situés dans le contexte des réactions en cascade du réseau idiotypique, permettent alors d'établir une stratégie vaccinale incluant une mémoire immunitaire à long terme. L'approche concernant tout particulièrement la mimicrie de la glycoprotéine de 38 kDa de *S. mansoni* sera largement développée dans un chapitre ultérieur.

D'autre part, Powell et Colley (1985) soulignent la fréquence des réponses anti-idiotypes durant l'infection à *S. mansoni* et sont les premiers à proposer leur rôle immunorégulateur dans la réponse granulomateuse et dans le maintien d'une infection chronique. Il a été d'ailleurs récemment rapporté (Nyindo *et al.*, 1995) qu'une vaccination par des anticorps anti-idiotypes polyclonaux, préparés à partir d'Ab1 spécifiques d'antigène de cercaires irradiées, pouvait moduler la pathologie chez des babouins infectés par *S. mansoni*.

4.3.4. Thérapie du cancer

En dépit du fait que l'organisme sait, dans le cas le plus général, reconnaître les cellules tumorales comme étrangères, et monter contre elles une réponse adaptée, des cellules tumorales échappent à la surveillance immunitaire: les clones lymphocytaires spécifiques des antigènes de ces tumeurs restent silencieux, dans un état de suppression (North *et al.*, 1982). A côté de procédures visant à exprimer leurs potentialités, les anticorps anti-idiotypes portant l'image interne d'antigène tumoral sont des candidats

intéressants pour tenter de mettre au point une nouvelle stratégie anti-tumorale, en court-circuitant cette suppression et en stimulant l'immunité. Herlyn *et al.* (1986) ont administré à des patients porteurs d'un cancer du colon des anticorps anti-idiotypes préparés contre des anticorps spécifiques d'antigène tumoraux produits par des cellules cancéreuses: dans certains cas, une résorption partielle de la masse tumorale a été observée, accompagnée même parfois d'une amélioration de l'état des patients. Ainsi l'injection d'Ab2 β mimant des antigènes tumoraux peut induire une réponse Ab3 anti-anti-idiotype protectrice et tumoricide, mais également une prolifération de lymphocytes T anti-anti-idiotype de type helper et suppresseur, comme de lymphocytes cytotoxiques. Bien que l'exploitation des anticorps anti-idiotypes comme outils immunothérapeutiques en cancérologie passe par la nécessité d'identifier de nouvelles cibles antigéniques sur les cellules tumorales, l'activité immunorégulatrice des Ab2 a été démontrée dans différents modèles à la fois chez l'animal et chez l'homme (partie Ia du tableau). Quant à l'efficacité de l'effet inhibiteur des anti-idiotypes sur la croissance tumorale (Herlyn *et al.*, 1996), des études précliniques et cliniques de phase 1 sont en cours.

4.3.5. Maladies auto-immunes

La tolérance à l'encontre des composants du soi n'est pas due à une absence de réponse mais correspond à une suppression active de clones cellulaires autoréactifs (Cohen et Wekerle, 1973; Feldman *et al.*, 1985). Rompue, elle conduit aux phénomènes d'auto-immunité ou de rejets de greffes.

Comme nous avons pu l'évoquer précédemment, les interactions idiotypiques sont impliquées dans l'établissement d'un répertoire de cellules B effectrices. La théorie de Jerne était donc logiquement en accord avec la génération d'anticorps auto-anti-idiotypes, mise en évidence pour la première fois par Rodkey (1974), tout comme avec l'idée d'une régulation idiotypique au sein de certaines maladies autoimmunes. Les anticorps anti-idiotypes pourraient donc jouer un rôle significatif en thérapeutique dans ce domaine.

Ainsi l'étude de la fluctuation du taux d'anticorps anti-idiotypes dans des maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux diffus ou la myasthénie (Dwyer *et al.*, 1986)

suggère que la présence d'anticorps anti-idiotypes pourrait avoir un effet bénéfique sur l'évolution de la maladie. De fait, dans des modèles animaux expérimentaux, il a été démontré que des anticorps anti-idiotypes pouvaient contribuer à l'inactivation, voire à la suppression de clones lymphocytaires producteurs des auto-anti-idiotypes associés à la maladie (De Baets *et al.*, 1987; De Kozak et Mirshahi, 1990). Mais là également, le repérage des antigènes responsables de l'auto-immunité, dont peu d'exemples d'Ab2 β existent (partie Ib du tableau), est un préalable important aux tentatives de ce type de traitement chez l'homme.

4.3.6. Applications des anticorps anti-idiotypes au diagnostic

L'étroite identité liant l'image interne et l'épitope antigénique correspondant a aussi été exploitée dans le domaine du diagnostic : ainsi des anticorps anti-idiotypes ont pu être utilisés dans le dosage d'un épitope de plasmodium dans les glandes salivaires du moustique par compétition avec l'antigène (Potocnjak *et al.*, 1982), ou encore comme immunoréactifs alternatifs dans le sérodiagnostic de la cysticerose bovine (Hayunga *et al.*, 1992).

4.4. Limites des applications thérapeutiques des anticorps anti-idiotypes

L'utilisation des anticorps anti-idiotypes présente de nombreux avantages. Utilisés comme antigène de substitution, ils représentent une alternative prometteuse de matériel vaccinal pour des antigènes dont la synthèse par clonage moléculaire n'est pas adaptée, ou encore pour des antigènes non disponibles en taux suffisant comme dans le cas des parasitoses à *Leishmanie* ou aux filaires. Ils peuvent également biaiser le problème des conditions d'utilisation thérapeutique que pose certains antigènes tels que la toxine "killer" (dont les paramètres optimaux d'activité sont une température de 25°C et un pH de 4,6). D'autre part, ils permettent de contre-carrer le délai ontogénique, dû à la maturation tardive

des sous-populations de lymphocytes B Lyb5, dans la réponse aux polysaccharides pendant la période néonatale. Ainsi les anticorps anti-idiotypes peuvent même induire une immunité chez la souris Xid, modèle déficient en cellules B1 (Stein et Soderstrom, 1984).

Malgré ces différents avantages, les applications des anticorps anti-idiotypes en thérapeutique ou en prophylaxie humaine restent limitées. Ainsi, la production d'anticorps monoclonaux anti-idiotypes humains pose des problèmes techniques. En effet de par leur origine xénogénique, l'utilisation d'anticorps murins induit une forte réponse immunitaire chez l'homme qui neutralise leur activité et diminue leur demi-vie par une clearance rapide pouvant même être une source de réactions pathologiques diverses allant jusqu'à des chocs graves. Or, par les techniques du génie génétique, on peut désormais envisager la fabrication d'anticorps monoclonaux hybrides d'origine humaine, dont seule la partie porteuse des images internes proviendrait d'un anticorps monoclonal de souris: de telles molécules chimériques ont déjà été réalisées en particulier par Morrison *et al.* (1984).

D'autre part, la fréquence des anticorps anti-idiotypes porteurs d'image interne est très basse, de l'ordre de 100 fois plus faible que celle de la totalité des anticorps qui reconnaissent l'antigène.

De plus, ce modèle d'immunisation anti-idiotype suppose une définition des doses, d'un choix d'adjuvant non toxique ou de molécule porteuse, ou encore de la posologie de l'administration des anticorps anti-idiotypes permettant l'installation d'une immunité efficace et prolongée. A ces différents points, s'ajoute dans le cas d'un traitement anti-tumoral, la prise en considération de la nature de la tumeur et de son état de progression.

Comparativement aux vaccins classiques tués ou vivants atténués, les vaccinations anti-idiotypiques chez l'animal n'ont pas démontré l'induction d'une réponse anticorps supérieure quantitativement (en terme de titre), ou qualitativement (en terme d'affinité); d'ailleurs, les travaux récents de Goldbaum *et al.* (1997) ont montré une plus grande affinité des Ab3 pour les anticorps anti-idiotypes que pour l'antigène d'origine.

Enfin, alors que les vaccins classiques induisent des anticorps IgG comme classe prédominante, des anticorps d'isotype IgM prédominent dans la réponse humorale suivant

des vaccins idiotypiques. De même, en général, ils n'induisent pas efficacement de mémoire immunitaire forte et durable, prérequis essentiel à tout bon vaccin.

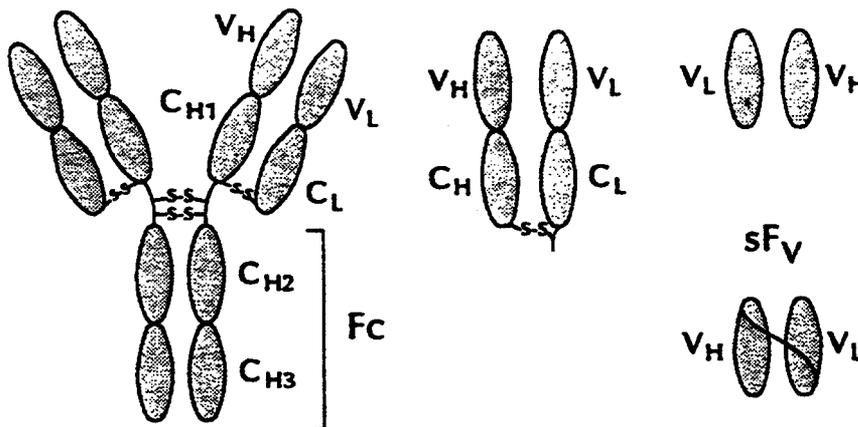
Ces différents éléments expliquent l'insuccès des vaccins idiotypiques à pénétrer le champ de la vaccinologie humaine, malgré leur efficacité prouvée lors d'essais précliniques. Mais désormais les anticorps anti-idiotypes trouvent un potentiel thérapeutique certain que ce soit en cancérologie ou dans les maladies autoimmunes. De plus, ils représentent des outils immunitaires précieux dans l'identification et l'isolement de récepteurs cellulaires spécifiques.

5. Ingénierie des anticorps

Le site de liaison d'une molécule d'anticorps est formée par l'association des régions variables des chaînes légères et des chaînes lourdes. On peut créer différents fragments reproduisant la liaison à l'antigène. En effet, la construction d'un Fab peut ressembler étroitement à la structure native du site de liaison, en conservant les régions constantes adjacentes des chaînes lourdes et légères. Les domaines variables peuvent également être exprimés et associés pour former un fragment Fv.

5.1. Construction d'un sFv ou "single-chain antibody fragment variable"

Les progrès réalisés en biologie moléculaire ont permis la construction de molécules recombinantes basées sur la structure même des molécules d'anticorps où les résidus "charpente" maintiennent les régions hypervariables en place: elles consistent à lier une simple chaîne légère à une simple chaîne lourde de telle manière à former un site de liaison à l'antigène.



Différentes structures d'anticorps conservent l'activité de liaison à l'antigène. Abréviations: Ig, Immunoglobulines; Fab, fragment de liaison de l'anticorps; Fv, fragment de la région variable; sFv, fragment simple chaîne de la région variable; V_H , région variable de la chaîne lourde; V_L , région variable de la chaîne légère, C_H , région constante de la chaîne lourde, C_L , région constante de la chaîne légère.

Les régions variables d'anticorps simple chaîne sont générées par liaison des gènes codant pour une région variable de chaîne légère (V_L) et pour une région variable de chaîne lourde (V_H), au moyen d'ADN codant pour une séquence "linker" d'approximativement 15 acides aminés tels que $(Gly_4Ser)_3$ (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988).

5.2. Avantages et applications thérapeutiques des sFv

Les molécules sFv présentent de nombreux avantages comparativement aux anticorps entiers. Plus petits en taille (25 kDa) qu'une immunoglobuline entière (par exemple une IgG a un PM de 150 kDa), ils sont donc moins immunogéniques et ils conservent cependant leur spécificité de liaison à l'antigène. Dans les modèles tumoraux chez la souris, ils montrent une pénétration plus efficace aux niveaux des sites de tumeurs comparativement aux anticorps monoclonaux intacts ou aux fragments Fab, avec un taux de clearance rapide, ce qui leur permet une meilleure accessibilité *in vivo* (Colcher *et al.*, 1990; Yokota *et al.*, 1992). Les sFv recombinants sont également plus adaptables qu'un anticorps monoclonal natif: une fois que les gènes codant pour les domaines V_L et V_H sont codés, ils peuvent être facilement manipulés pour obtenir des ligands "faits sur mesure" capables de déclencher ou de bloquer une activité biologique. Par exemple, il est possible de construire de petites molécules simple chaîne bispécifiques (Traunecker *et al.*, 1991; Hayden *et al.*, 1994), qui peuvent être fusionnées à un domaine enzymatique (alors appelées abzymes); ou encore à une toxine (immunotoxines) telles que l'exotoxine 40 de *Pseudomonas* (PE40), qui tuent directement les cellules tumorales (Kreitman *et al.*, 1990; Brinkmann *et al.*, 1991).

De plus, on peut rendre ces sFv "immunosilencieux" par greffe de CDR ou encore par d'autres techniques, qui permettent de réduire l'antigénicité des protéines (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; Roguska *et al.*, 1994).

Ces fragments sFv offrent également des applications en thérapie génique parce qu'ils sont exprimés à partir d'un seul transcrit. En effet, ils peuvent être exprimés à l'intérieur des cellules afin de réduire l'expression protéique dans des cellules de mammifères (Werge *et al.*, 1994). Une application particulièrement intéressante de ce concept est d'une

part la réduction de l'infectivité des particules HIV-1 suite à l'expression intracellulaire d'un sFv se liant à une protéine de l'enveloppe du virus (Marasco *et al.*, 1993); et d'autre part l'inhibition de sa réplication suite à la liaison d'un sFv intracellulaire à la protéine régulatrice Rev du virus (Duan *et al.*, 1994). De la même manière, l'expression cytosolique d'un sFv dirigé contre une protéine membranaire du virus infectieux pour la plante *Icosahedral tombus*, réduit l'infection et retarde les premières attaques de la maladie (Tavladoraki *et al.*, 1993).

D'autre part, ils peuvent être de puissants inducteurs de la signalisation intracellulaire (Hayden *et al.*, 1994). Des événements tels que l'activation intracellulaire de tyrosine kinases et la mobilisation du calcium sont induits par la liaison au CD3 qui ne nécessite pas l'interaction au récepteur Fc. Leur tendance à former des multimères (Kortt, 1994) peut augmenter leur immunogénicité, d'autant plus que la mobilisation calcique est alors plus forte et que le CD3 des cellules T est modulé rapidement avec une cinétique d'action similaire à celle d'un anticorps entier. Ces réponses rapides peuvent être plus efficaces que la signalisation des cellules T initiée par l'interaction du complexe peptide-CMH au TCR.

5.3. Cas particulier de la mimicrie d'épitopes carbohydrates.

L'utilisation de molécules recombinantes telles que les sFv a été étendue au développement d'images protéiques d'épitopes carbohydrates relevant. En effet la faisabilité de cette approche a été montrée dans un premier temps par les études utilisant les anticorps anti-idiotypes mimant les polysaccharides de 3 pathogènes bactériens comme de véritables vaccins de substitution (McNamara *et al.*, 1984; Stein *et al.*, 1984; Westerinck *et al.*, 1988).

Cette stratégie alternative permet de biaiser d'une part les difficultés de synthèse des carbohydrates par les techniques de synthèse chimique, et d'autre part la faible immunogénicité, par exemple des antigènes capsulaires, attribuée à leur nature même de carbohydrate, et d'obtenir ainsi une réponse anticorps effective et mémoire spécifique de ces antigènes carbohydrates.

Différents exemples illustrent l'efficacité d'utilisation de tels sFv. Par immunisation, ces peptides recombinants peuvent induire une protection contre une infection à dose létale de *Neisseria meningitidis* du groupe C (Westerinck *et al.*, 1995), neutraliser l'activité de différentes souches de virus d'immunodéficience humaine (Agadjanyan *et al.*, 1997), ou encore induire une réponse immunitaire anti-carbohydrate dirigée contre des cellules tumorales du sein et médier leur destruction par un mécanisme dépendant du complément (Kieber-Emmons *et al.*, 1997). Enfin, les récents travaux de Magliani *et al.* (1998) ont démontré qu'un sFv issu d'anticorps anti-idiotype mimant la conformation d'un antigène capsulaire de streptocoque du groupe B, était capable d'entraîner non seulement une réponse anticorps mais surtout une mémoire immunitaire. De plus, dans cette même étude, l'immunisation maternelle avec de tels peptides recombinants protège les souriceaux contre une infection.

6. Image interne de la gp38 **de *Schistosoma mansoni***

Nous avons décrit dans un chapitre précédent la production d'un anticorps monoclonal IgG2a de rat spécifique de *S. mansoni*. Cytotoxique vis-à-vis des schistosomules en présence d'éosinophiles, il permettait une protection par transfert passif chez le rat (Grzych *et al.*, 1982). Cet anticorps, appelé IPLSm1, a permis de définir un antigène cible à la surface du schistosomule, une glycoprotéine de 38 kDa (gp 38) (Dissous, 1982), fortement immunogénique au cours de l'infection par schistosome dans différentes espèces animales ainsi que chez l'homme (Dissous *et al.*, 1984). Bien que théoriquement cette molécule représente un excellent candidat vaccin contre la schistosomiase, la nature glycanique de l'épitope reconnu par l'IPLSm1 a limité son utilisation par les techniques courantes de biologie moléculaire.

De plus, il a été démontré que cette glycoprotéine de 38 kDa était capable d'induire la production d'anticorps bloquants IgG2c qui inhibaient les propriétés fonctionnelles de l'IgG2a à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cet aspect limitait donc considérablement son intérêt dans l'établissement possible d'une immunité.

Ces résultats ont donc conduit Grzych *et al.* (1985) à choisir, sur la base de la théorie du réseau idiotypique de Jerne, la stratégie alternative des anticorps anti-idiotypiques permettant de construire à partir d'un épitope glycanique son image interne protéique.

-Production d'anticorps anti-idiotype mimant l'épitope glycanique de la gp38

La production des anticorps anti-idiotypes contre l'anticorps monoclonal IPLSm1 a été envisagée dans un système d'hybridation homologue (rat x rat).

Parmi les différents anticorps monoclonaux Ab2 sélectionnés sur leur capacité à inhiber la fixation de l'anticorps IPLSm1 à son antigène cible, l'un d'eux d'isotype IgM (JM8-36) a fait l'objet d'études plus approfondies.

-Propriétés de l'Ab2 β JM8-36

Injecté chez le rat, il induit la production d'anticorps Ab3 spécifiques du schistosome, et plus particulièrement spécifiques de la surface du schistosomule, capables d'inhiber la fixation de l'IPLSm1 (Ab1) à son antigène cible. De plus, ces Ab3 sont cytotoxiques pour le schistosomule en présence d'éosinophiles et, transférés passivement, ils induisent une protection comparable à celle obtenue avec les Ab1.

Enfin, les animaux immunisés par l'anticorps anti-idiotype JM8-36 sont protégés significativement (50 à 75%) vis-à-vis d'une infection cercarienne d'épreuve. Ces différents éléments confirment donc que l'anticorps monoclonal anti-idiotype JM8-36 porte bien l'image interne de l'épitope glycanique défini par l'anticorps IPLSm1 sur la glycoprotéine de 38 kDa.

OBJECTIFS

Chez l'Homme et dans les modèles expérimentaux, une relation liant la réponse IgA et l'expression d'une immunité à la schistosomiase a été clairement établie. D'autre part, des travaux réalisés dans le modèle murin relatent que cette réponse IgA augmente très fortement après oviposition, et qu'elle s'avère très réduite en absence d'œufs chez des animaux soumis à une infection monosexuée. Dans ce contexte, la première partie de nos travaux démontrera la potentialité des antigènes d'œufs (stade très riche en carbohydrates), à induire une réponse IgA au niveau pulmonaire chez le rat, nous permettant ainsi de caractériser les composantes cellulaires impliquées dans ce modèle.

L'importance des glycoconjugués de schistosome dans la réponse immune de l'hôte vis-à-vis du parasite, nous a incités à analyser les propriétés immunorégulatrices de ces antigènes.

L'anticorps monoclonal IPLSm1 est un anticorps cytotoxique vis à vis du schistosomule *in vitro*, et protecteur *in vivo* par transfert passif. Il a permis de caractériser un antigène cible de surface, la glycoprotéine de 38 kDa, qui apparaît être un immunogène majeur dans différents systèmes d'infection expérimentale et humaine. L'implication de cet antigène dans la protection du rat contre l'infection par *S. mansoni* a été démontrée de deux manières différentes : tout d'abord par l'immunisation de l'anticorps monoclonal correspondant à l'anti-idiotype de l'épitope glycanique, puis par l'immunisation active et passive de la KLH, molécule portant ce même épitope glycanique d'intérêt. Ces démonstrations nous ont permis de définir différentes stratégies d'approche pour accéder à l'étude de l'épitope carbohydrate protecteur. Puis dans un second temps, nous apporterons différentes caractéristiques d'ordre biochimique et immunologique sur l'épitope glycanique commun "actif": soit à partir d'un fractionnement de la KLH, soit par défaut, en déglycosylant cette molécule.

Enfin, dans la seconde partie de nos travaux, nous décrirons d'une part la construction d'un fragment anticorps anti-idiotype, image interne de l'épitope glycanique de la glycoprotéine de 38 kDa, et d'autre part son expression dans différents systèmes bactériens, mammifères ou en cellules d'insectes, ainsi que la réponse induite par chaque protéine recombinante respectivement obtenue, dans leurs limites d'application *in vivo*.

RESULTATS

Partie I :

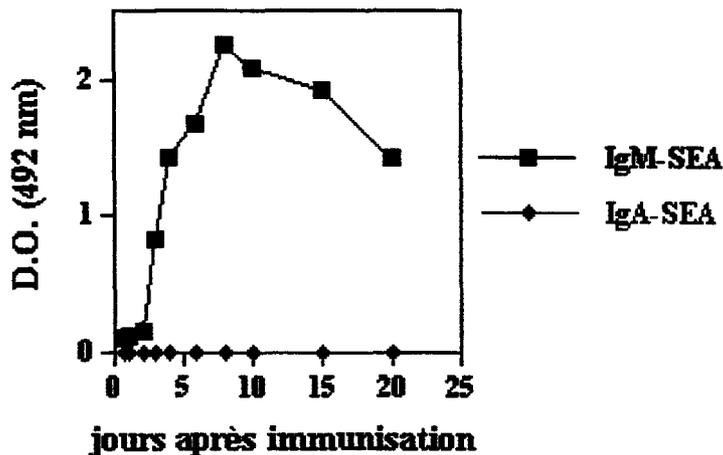
***Approche des propriétés immunomodulatrices
des antigènes d'œufs et
de la glycoprotéine de 38 kDa
dans l'immunité spécifique du parasite S. mansoni
chez le rat***

1. Induction d'une réponse IgA chez le rat par les antigènes d'œufs de schistosome.

Dans la perspective de développer une stratégie vaccinale muqueuse, il apparaît indispensable de mieux connaître les mécanismes d'induction d'une réponse IgA. Ces anticorps sont impliqués par excellence dans la protection des surfaces muqueuses. Chez le rat, leur étude reste limitée en raison du développement très récent d'outils biologiques spécifiques, mais surtout de par la physiologie particulière de ce modèle. Lors d'une simple infection par *S. mansoni*, il existe chez le rat un transport actif des IgA du sang vers la bile, véritable « pompe à IgA », qui enfreint la détection d'une réponse au niveau pulmonaire. Cet animal présente la particularité supplémentaire d'être un hôte semi-permissif, dans lequel les vers qui n'atteignent pas leur maturité, ne pondent pas d'œufs. Or, comme nous avons pu l'évoquer précédemment, l'œuf est un stade particulièrement immunogène, qui s'est révélé avoir un rôle fondamental dans l'apparition de la réponse IgA, particulièrement dans le modèle murin. C'est dans ce contexte que nous avons envisagé l'injection intra-veineuse d'œufs de schistosome chez le rat et analysé la réponse cellulaire associée, au niveau moléculaire (production d'ARNm de cytokines évaluée par RT-PCR semi-quantitative) et protéique (production de cytokines dans un système de restimulation *in vitro*).

1.1. Etude de la réponse humorale sérique et muqueuse

Afin d'évaluer la réponse humorale spécifique du SEA (Soluble Eggs Antigen), les sérums et les lavages broncho-alvéolaires (LBA) des rats injectés avec des œufs de *S. mansoni* ont été testés par la méthode ELISA. L'analyse de la réponse anticorps au niveau sérique des rats injectés montre une augmentation progressive des anticorps IgM spécifiques du SEA, à partir du troisième jour après l'injection d'œufs et un maximum au 8^e jour. Aucune réponse IgA spécifique n'a été détectée dans ces sérums à cette période.



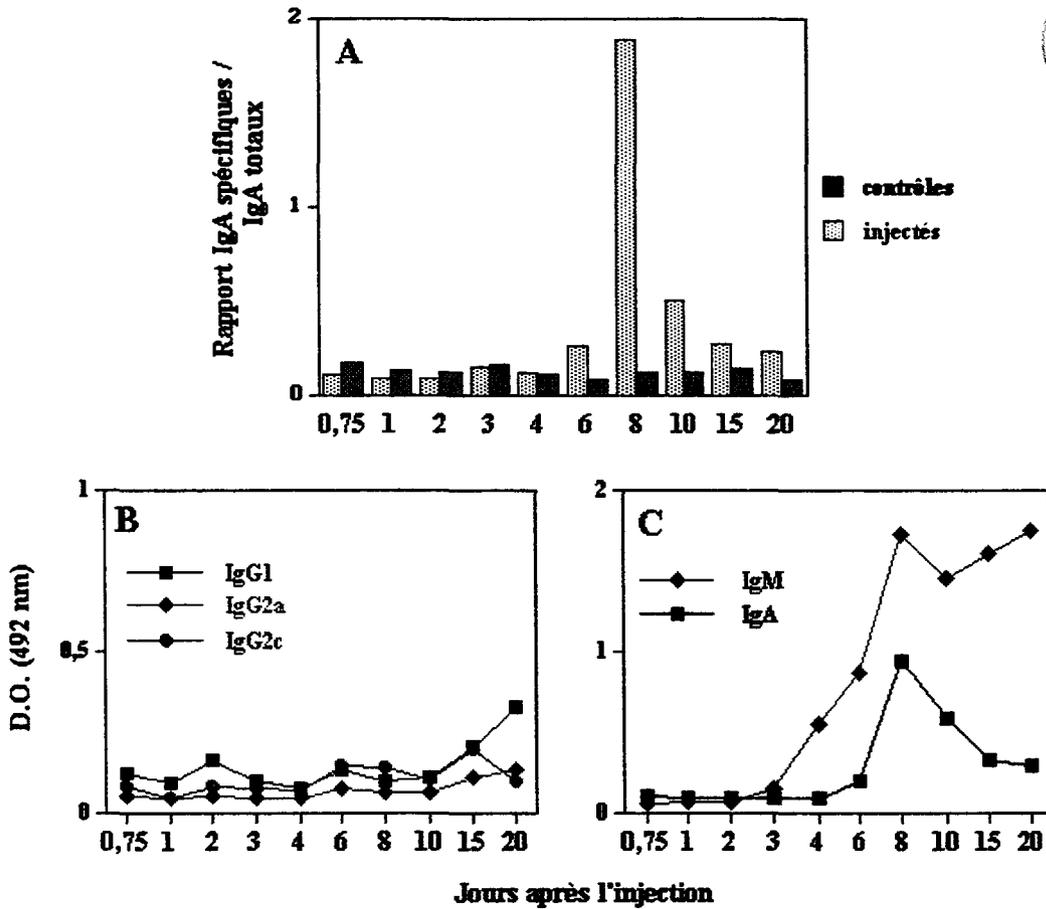
Réponse sérique chez des rats FISHER injectés par des œufs de *S. mansoni*

Ces valeurs moyennes de densité optique sont obtenues à partir des sérums (dilués au 1/1000e pour les IgM et au 1/50e pour les IgA) de 2 rats par point de cinétique, testés en ELISA pour leur spécificité vis-à-vis du SEA.

Ces résultats sont représentatifs de 2 cinétiques réalisées après l'injection de 5000 œufs vivants en IV, à j0, chez le rat FISHER.

Le profil de la réponse anticorps au niveau pulmonaire est très différent. En effet, des anticorps IgA spécifiques sont détectés dès le 6^e jour après l'injection, avec un pic d'expression au 8^e jour d'autant plus visible lorsque l'on représente le rapport entre les IgA spécifiques et les IgA totales (figure A). La caractérisation des isotypes IgG spécifiques (figure B) révèle l'absence d'anticorps IgG_{2a} et IgG_{2c} sur la période représentée ainsi qu'une amorce de production d'IgG₁, qui débute 20 jours après l'injection d'œufs. Une

production d'anticorps IgM spécifiques est observée (figure C) : avec un maximum au 8^e jour. Elle reste intense et stable pour la cinétique considérée.

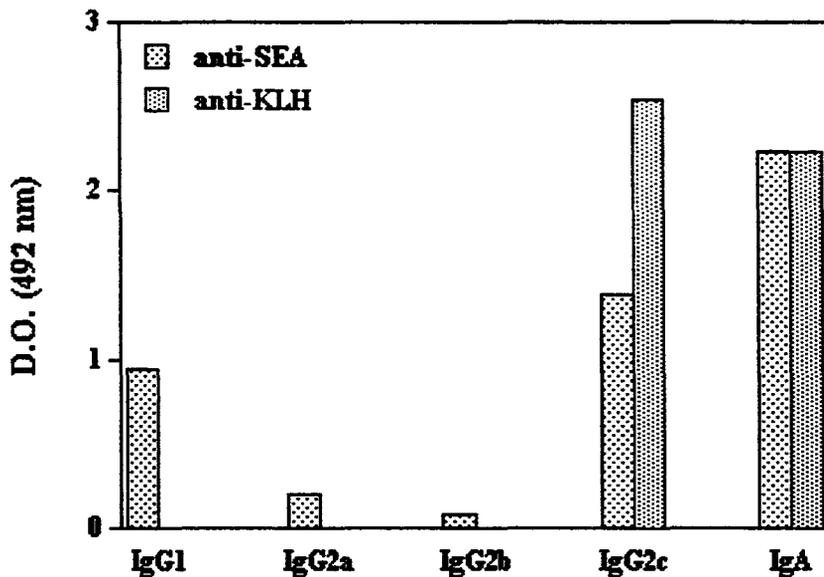


**Réponse isotypique spécifique du SEA au niveau des LBA
de rats FISHER injectés par des œufs en IV**

- (A) Rapport entre les IgA spécifiques du SEA et les IgA totales au niveau des LBA
- (B) Analyse du profil des différentes IgG pulmonaires spécifiques du SEA
- (C) Analyse des anticorps IgA et IgM pulmonaires spécifiques du SEA

Ces valeurs moyennes de densité optique sont obtenues à partir des LBA (dilués au 1/5e ou au 1/10e) de 2 rats par point de cinétique, testés en ELISA pour leur spécificité vis-à-vis du SEA. Ces résultats sont représentatifs de 2 cinétiques réalisées après l'injection de 5000 oeufs vivants en IV, à j0, chez le rat FISHER.

Toutefois sur une cinétique prolongée, une seconde injection d'œufs 3 semaines après la première (soit à j21), induit une réponse IgA stable au niveau pulmonaire, puisqu'elle est encore observée à j42. En ce qui concerne les autres isotypes, la réponse IgG1, initiée 20 jours après la première injection, est toujours observée à j42. Une réponse intense de l'isotype IgG2c est alors détectée, d'autant plus intéressante qu'elle s'avère spécifique à la fois du SEA et de la KLH.



Réponse pulmonaire spécifique du SEA et de la KLH

42 jours après une injection d'œufs en IV chez la rat

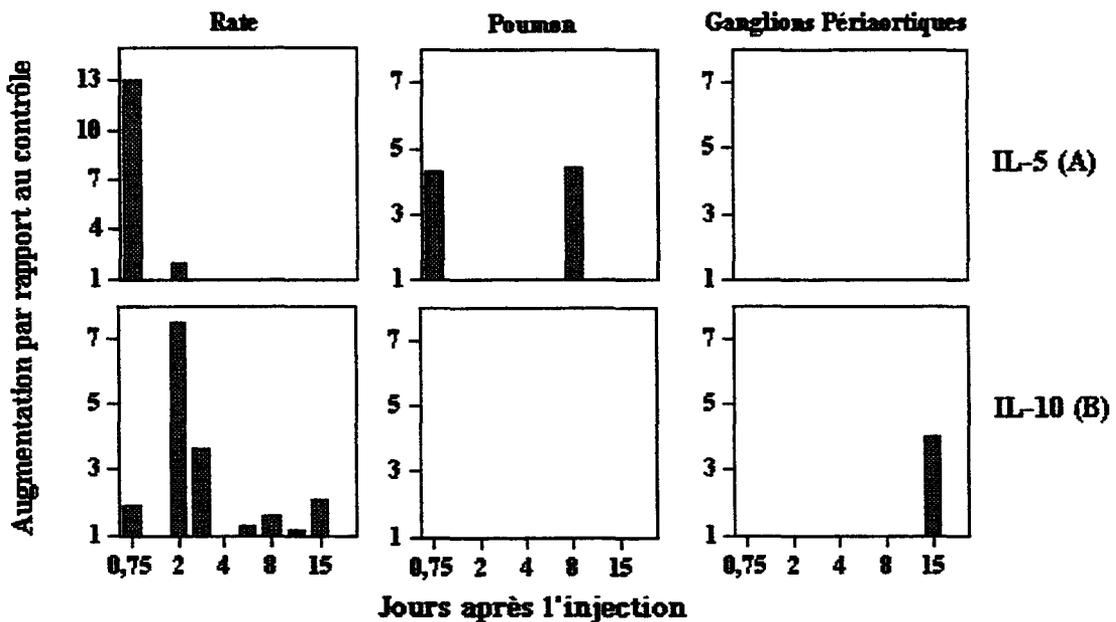
Ces valeurs moyennes de densité optique sont obtenues à partir des LBA (dilués au 1/5e ou au 1/10e) de 4 rats par point de cinétique, testés en ELISA pour leur spécificité vis-à-vis du SEA et de la KLH. Ces résultats sont représentatifs de 2 cinétiques réalisées après l'injection de 5000 oeufs vivants en IV, à j0, chez le rat FISHER.

1.2. Etude de la réponse cellulaire

1.2.1. Analyse du profil de cytokines *in vivo*

Nous disposons dès lors d'un modèle nous permettant d'étudier la cascade des cytokines associées à l'établissement d'une réponse IgA chez le rat. Nous avons donc analysé (par la technique de RT-PCR semi-quantitative), la production des cytokines IL-4,

IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ et TGF- β , à partir de l'ARNm extrait des rates, des poumons et des ganglions périaortiques de ces animaux. Après différentes expériences, nous avons déterminé pour chaque paire d'oligonucléotides spécifiques, le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour atteindre des signaux d'hybridation spécifique optimaux : soit 25 cycles pour la β -actine, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ et 30 cycles pour l'IL-6 et le TGF- β .



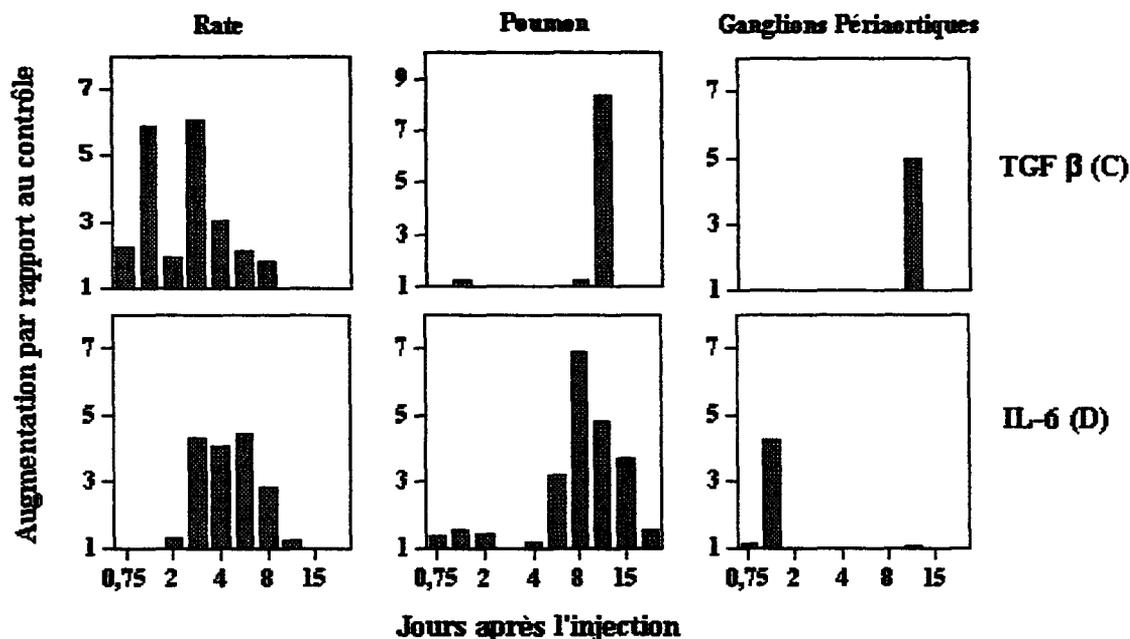
Expression d'ARNm d'IL-5 et d'IL-10 au niveau de la rate, des poumons et des ganglions périaortiques de rats immunisés par des œufs en IV

Quantification de l'expression de l'ARNm de l'IL-5 et de l'IL-10 au niveau de tissus isolés de 2 rats immunisés par des œufs en IV et d'un rat contrôle injecté par du PBS, pour chaque point de cinétique. Le taux de ces cytokines est évalué par RT-PCR (cf §2.1.3 du Matériel et Méthodes). Ces résultats, spécifiques d'une expérience représentative de 2 études cinétiques, sont présentés en augmentation par rapport au contrôle : une augmentation supérieure à 2 fois le contrôle est considérée significative.

Les rates des rats injectés révèlent une expression ponctuelle mais significative de l'ARNm codant pour l'IL-5 dès 18 h (0.75 jour) (figure A). Une expression plus faible, transitoire au 8^e jour, est détectée à la même période dans les poumons pour la même cytokine. Aucun ARNm spécifique pour l'IL-5 n'a été détecté dans les ganglions

périoraortiques.

Concernant l'expression du gène de l'IL-10 (figure B), une augmentation significative est rapportée au niveau splénique dès le 2^e jour. Mais, alors qu'aucun ARNm codant pour l'IL-10 n'a été observé dans les poumons, une production tardive est détectée au niveau des ganglions périaortiques au 15^e jour.



Expression d'ARNm de TGF-β et d'IL-6 au niveau de la rate, des poumons et des ganglions périaortiques de rats immunisés par des œufs en IV

Quantification de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 et du TGF-β au niveau de tissus isolés de 2 rats immunisés par des œufs en IV et d'un rat contrôle injecté par du PBS, pour chaque point de cinétique. Le taux de ces cytokines est évalué par RT-PCR (cf §2.1.3 du Matériel et Méthodes). Ces résultats, spécifiques d'une expérience représentative de 2 études cinétiques, sont présentés en augmentation par rapport au contrôle : une augmentation supérieure à 2 fois le contrôle est considérée significative.

En figure C, des taux significatifs d'ARNm codant pour le TGF-β, particulièrement importants au premier et troisième jour, ont été enregistrés dans la rate tout au long de la cinétique considérée. Au 10^e jour, leur expression apparaît ponctuellement à la fois dans les ganglions périaortiques et dans les poumons.

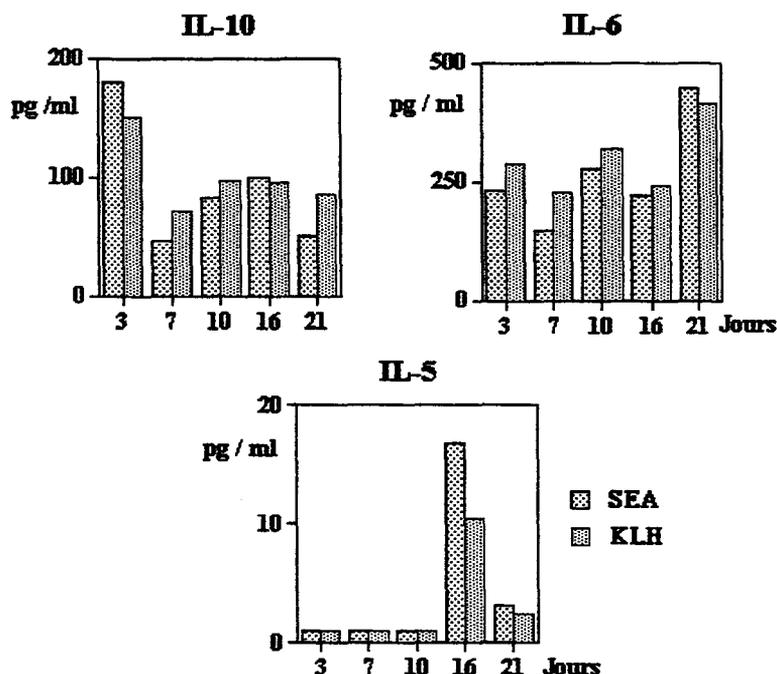
L'évaluation de l'ARNm codant pour l'IL-6 (figure D) révèle une production brève et précoce le premier jour dans les ganglions périaortiques, suivie d'une production durable au

niveau splénique à partir du 3^e jour jusqu'au 8^e jour; cette production est elle-même relayée durablement au niveau pulmonaire à partir du 6^e jour.

Enfin, aucun ARNm codant pour l'IL-4 ou l'IFN- γ n'a été mis en évidence dans nos conditions expérimentales pour les tissus considérés.

1.2.2. Analyses préliminaires des cytokines après restimulation *in vitro*

La disponibilité des anticorps spécifiques d'interleukines de rat étant limités, nous avons restreint notre étude à la recherche de l'IL-6, IL-10 et IL-5 produites au niveau de la rate (rappelons que l'absence d'ARNm d'IFN- γ et d'IL-4 *in vivo* n'a pas motivé notre étude de ces cytokines par restimulation). Les splénocytes de rat ont été mis en culture à 1, 3, 7, 10, 16 et 21 jours après l'injection d'œufs. Les agents de stimulation sont respectivement la Con-A (concanavaline A), le SEA et la KLH.



Expression protéique de l'IL-10, l'IL-6 et l'IL-5 suite à la restimulation *in vitro*, par du SEA ou de la KLH, de splénocytes de rats immunisés par des œufs en IV

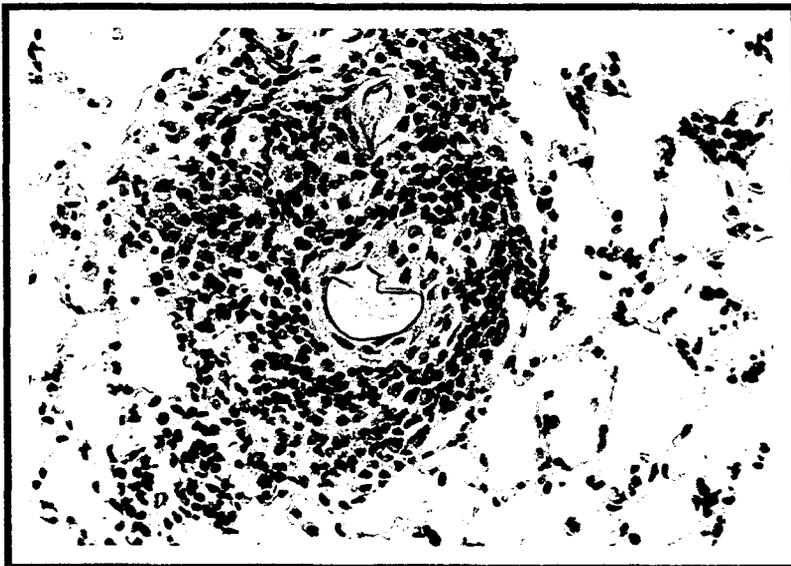
Analyse de la production de cytokines par les splénocytes totaux de rats FISHER sains ou immunisés par des œufs en IV. Les cellules de la rate, collectées aux différents points de cinétique après l'injection, sont stimulées *in vitro* avec un mitogène (Con-A) ou les antigènes SEA et KLH. Elles sont mises en culture par pool de 2 rates pour chaque groupe d'animaux immunisés ou sains.

Sous l'effet de la Con-A, nous avons pu stimuler la production de chacune de ces cytokines alors que la production constitutive de ces cytokines chez des rats sains reste négligeable.

Les splénocytes des rats immunisés par des œufs produisent de l'IL-6 indifféremment en réponse à la stimulation par le SEA ou la KLH, sur toute la cinétique considérée en s'intensifiant à j21. Parallèlement, la sécrétion d'IL-5 n'est détectée qu'au 16^e jour, et principalement en réponse à la stimulation par le SEA. Enfin l'analyse de la production d'IL-10, mise en évidence dans nos conditions expérimentales, révèle une sécrétion précoce 3 jours après l'injection d'œufs ; elle diminue ensuite mais reste stable sur les temps de cinétique considérés.

1.2.3. Cellules sécrétrices

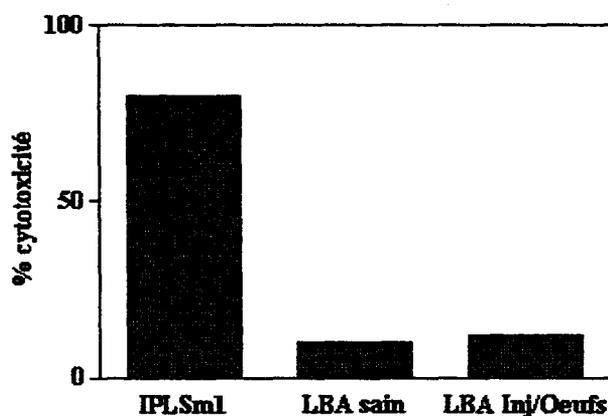
La cyto centrifugation des cellules recueillies lors des lavages broncho-alvéolaires (LBA) des rats immunisés par des œufs, nous a permis d'évaluer par simple comptage sur lame après coloration, une infiltration de 30% d'éosinophiles au niveau de ce site muqueux, par rapport aux cellules de LBA de rats sains. On peut également remarquer une augmentation de macrophages alvéolaires et de neutrophiles (non chiffrée).



Pseudogranulome induit au niveau de la muqueuse pulmonaire suite à une injection d'œufs de schistosome en intra-veineuse chez le rat. Coloration à l'éosine et au bleu de méthylène.

1.3. Etudes de fonctionnalité

Des tests ont été pratiqués *in vitro* afin d'évaluer la cytotoxicité des anticorps IgA détectés au niveau des lavages broncho-alvéolaires recueillis chez les rats immunisés par des œufs en I.V. Que ce soit en présence d'éosinophiles ou de macrophages de rat. Aucun effet cytotoxique vis-à-vis de schistosomules n'a pu être mis en évidence pour ces échantillons.



Cytotoxicité dépendante de macrophages vis-à-vis de schistosomules de *S. mansoni*

Les pourcentages de cytotoxicité de l'IPLSm1 ou des anticorps pulmonaires sont mesurés après 48h d'incubation avec les cellules effectrices.

Nous avons recherché *in vivo* une fonctionnalité de cette réponse IgA induite au niveau pulmonaire dans le cadre d'une infection à *S. mansoni*. Pour cela, nous avons réalisé diverses expériences de protection dans des conditions variables : en fonction du nombre d'injection d'œufs ; du délai de temps observé après l'instauration de la réponse IgA pour réaliser l'infection ; dans l'espèce animale considérée, à savoir le rat Lou-M ou le rat FISHER. Malgré ces différentes conditions, aucune différence significative n'a pu être observée dans la charge vermineuse des rats immunisés et infestés, par rapport à celle des rats témoins.

Expériences	Injection des rats par du PBS	Injection des rats par 5000 oeufs
1	149 ± 46	150 ± 40
2	199 ± 29	187 ± 32
3	179 ± 38	164 ± 33

Ces valeurs moyennes et écarts-type représentent la charge en vers de 7 rats Lou – M, injectés par du PBS ou des œufs, infectés 8 jours après à raison de 1000 furcocercaires par rat, et enfin perfusés à j29.

2. Etudes de l'épitope glycanique commun à la glycoprotéine de 38kDa de *S. mansoni* et à l'hémocyanine de *Megathura crenulata* (KLH)

2.1. Caractérisation biochimique

Cette partie de notre travail de thèse a fait l'objet d'une collaboration avec le Pr J. Montreuil et le Dr M. Nita-Lazar (Laboratoire de Chimie biologique, UMR 111 du CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille I) qui nous ont fourni le matériel nécessaire à nos expérimentations.

2.1.1. Préparation du matériel biologique

a) Fractionnement de la KLH par chromatographie d'immuno-affinité

La KLH a été déposée sur une colonne d'anticorps monoclonaux IPLSm1 fixés sur Sépharose 4B. Les fractions retenues sur la colonne ont été ensuite éluées par un gradient de force ionique et de pH. Le passage d'un premier tampon fournit deux fractions (B0 et B1) de faible affinité pour l'anticorps. Un autre tampon a élué une fraction B2 et enfin, un tampon au pH plus acide a conduit à l'élué d'une fraction B3 de forte affinité. Ces fractions sont ensuite dialysées contre de l'eau distillée, et lyophilisées.

b) Hydrazinolyse des glycanes de la KLH

Cette réaction conduit à la coupure de la chaîne peptidique et des chaînes oligosaccharidiques sous forme d'hydrazones, ainsi qu'à la dé-N-acétylation des chaînes glycaniques. Elle a ainsi permis de libérer les chaînes glycaniques (de type O- et N- en fonction de la température de réaction) de la KLH. Nous avons pu confirmer que cette molécule comportait 4,5% de glucides, pourcentage déjà déterminé par chromatographie en phase gazeuse (DEA M. Nita-Lazar, 1995). La chromatographie en couche mince a montré que la plupart des glycanes étaient formés d'environ 10 unités monosaccharidiques. La

chromatographie HPLC (Chromatographie Liquide en Haute Pression) effectuée sur colonne MonoQ à partir de 37 mg du mélange d'oligosaccharides, a conduit à l'obtention d'une fraction majeure de glucides neutres (31,2 mg) et de 3 fractions mineures de glucides acides (respectivement de 1,8 mg, 2 mg et 1,8 mg).

2.1.2. Etude de la structure glycanique

a) Composition en glucides

La composition en monosaccharides de la KLH native et de la fraction B3 obtenue par chromatographie d'immuno-affinité est donnée dans ce tableau. Les points les plus importants à souligner sont la présence d'une faible proportion de xylose, de N-acétylglucosamine et de N-acétylgalactosamine, la richesse en fucose et l'absence d'acide sialique.

Monosaccharides	KLH	Fraction B3
Fucose	2,89	1,36
Galactose	3,6	2
Xylose	0,2	0,2
Mannose	3	3
N - Acétylglucosamine	1,7	2
N - Acétylgalactosamine	1,2	1,6

Composition molaire en monosaccharides de la KLH native et de la fraction B3, calculée sur la base de 3 résidus de mannose.

b) Analyse électrophorétique

La KLH native renferme différentes protéines de masse moléculaire comprise entre 45 et 240 kDa, dont la majeure partie a été séparée des fractions B1, B2 et B3 par chromatographie d'immuno-affinité. La fraction B3 ne compte plus que 8 à 10 protéines réparties en 3 groupes sur la base des masses moléculaires suivantes : 40-70kDa ; 190-200 kDa et 240-280 kDa (gel non présenté).

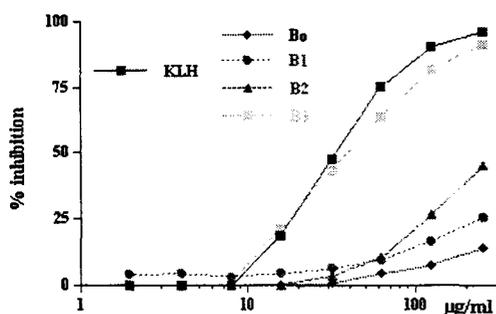
c) Détection des épitopes par la technique d'électrotransfert

La détection par les anticorps IPLSm1 montre l'absence totale de réactivité des fractions B0, B1 et B2, contrairement à la fraction B3 qui porte les épitopes glucidiques qui semblent se concentrer principalement dans la fraction de faible masse moléculaire (blot non présenté).

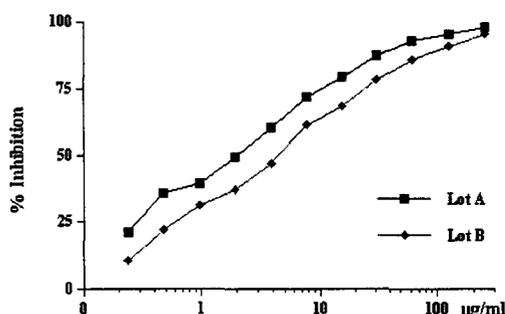
2.2. Etudes immunologiques de l'épitope commun

2.2.1. Mesure du potentiel inhibiteur des fractions

Après avoir mis au point les conditions optimum d'inhibition de fixation de l'anticorps IPLSm1 sur la KLH (cf §2.2.1. du Matériel et Méthodes), nous avons testé les différentes fractions séparées par chromatographie d'affinité. Seule la fraction B3 présente la capacité d'inhiber la fixation de l'IPLSm1 sur la KLH de façon identique à la molécule native elle-même, les autres fractions manifestant des taux variables d'inhibition.



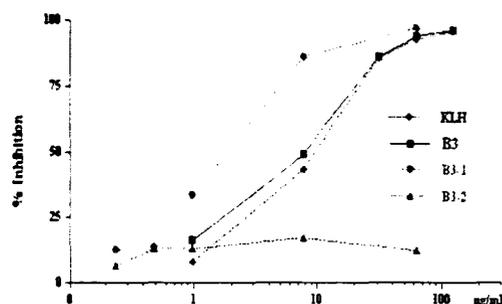
Inhibition de la fixation de la KLH sur l'IPLSm1 par différentes fractions



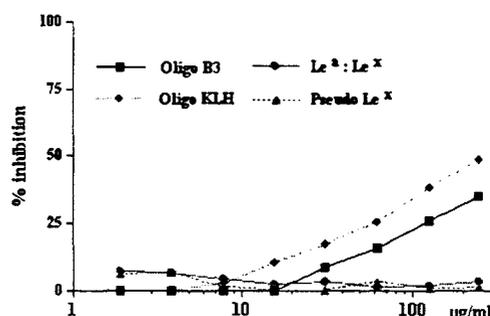
Inhibition de la fixation de l'IPLSm1 sur la KLH par différents lots de SFA

Cette fraction B3, qui présente le maximum d'inhibition, a subi une nouvelle purification par chromatographie d'immuno-affinité sur colonne d'IPLSm1, et a donné 2 sous-fractions B3-1 et B3-2 testées dans les mêmes conditions.

De même, différentes préparations disponibles ont été évaluées dans leur capacité à inhiber la fixation de l'IPLSm1 sur la KLH, afin d'identifier une quelconque réaction croisée entre notre épitope d'intérêt et des échantillons connus tels qu'un mélange $Le^a:Le^x$, du pseudo- Le^x , et des sucres LNFP I, II et III.



Inhibition de fixation de la KLH sur l'IPLSm1 par différentes sous-fractions de la B3



Inhibition de fixation de la KLH sur l'IPLSm1 par différentes fractions oligosaccharidiques

Seule la fraction B3-1 présente une forte inhibition de fixation de l'IPLSm1 sur la KLH à de très faibles concentrations. Seul ou en mélange, aucun sucre connu ne s'est révélé compétiteur de notre épitope d'intérêt dans nos conditions expérimentales. Une hydrazynolyse des fractions B3 et de la fraction globale de KLH (respectivement dénommée « oligo B3 » et « oligo KLH ») diminue leur sensibilité d'inhibition de la fixation de la KLH native sur l'anticorps IPLSm1, pour de faibles concentrations.

N'ayant pas pu mener à terme les étapes de purification de l'épitope d'intérêt, nous nous sommes replié sur une stratégie de déglycosylation de la molécule de KLH.

2.3. Approche «par défaut» des propriétés immunomodulatrices des glycanes de la KLH

Cette approche globale des propriétés immunologiques des glycanes portés par la KLH a représenté une alternative à la purification de l'épitope commun à la glycoprotéine de 38 kDa.

2.3.1. « Déglycosylation » de la KLH

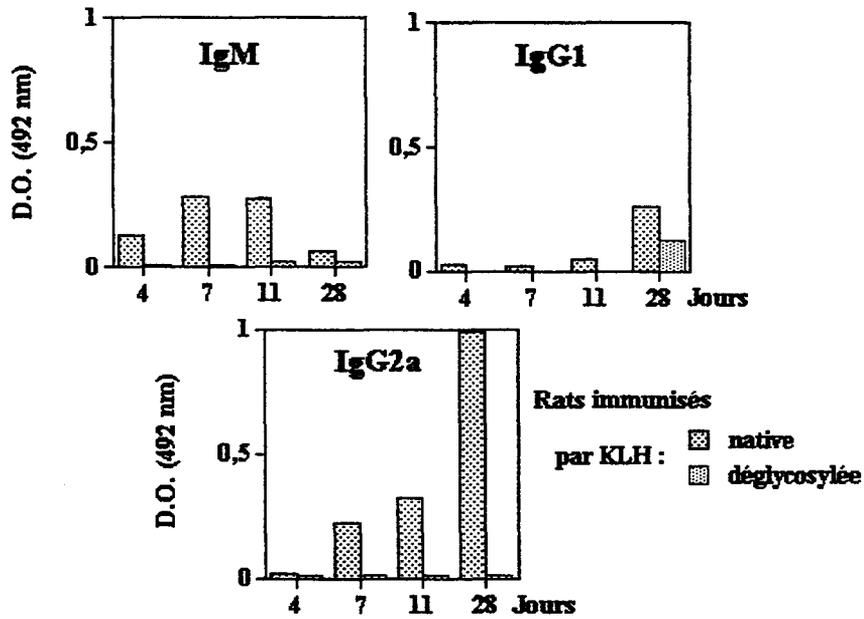
L'action du métapériodate nous a permis d'oxyder la KLH (plus exactement de transformer les fonctions α -glycols en aldéhydes) afin d'approcher « par défaut » le rôle des glycanes portés par la KLH, et plus particulièrement celui de l'épitope d'intérêt ainsi délété, dans l'infection par *S. mansoni*. Nous appellerons abusivement « KLH déglycosylée », la protéine résultant de cette réaction chimique.

Nous avons ensuite vérifié par ELISA que l'anticorps monoclonal IPLSm1 était incapable de lier cette molécule de KLH déglycosylée. De même, nous avons confirmé que la KLH déglycosylée abolissait toute inhibition de fixation de la molécule native sur l'anticorps IPLSm1. Nous avons convenu de dénommer KLHn la molécule de KLH native, et KLHd la molécule de KLH déglycosylée.

2.3.2. Réponse humorale

L'analyse de la réponse isotypique chez des rats immunisés par de la KLH native révèle une production majoritaire d'IgG2a. Parallèlement les réponses IgM (précoces) et IgG1 (plutôt dès j28) restent relativement faibles. Aucune réponse d'isotype IgG2c, ni

Réponse sérique spécifique de la KLH, induite suite à une immunisation chez le rat par la molécule native ou déglycosylée



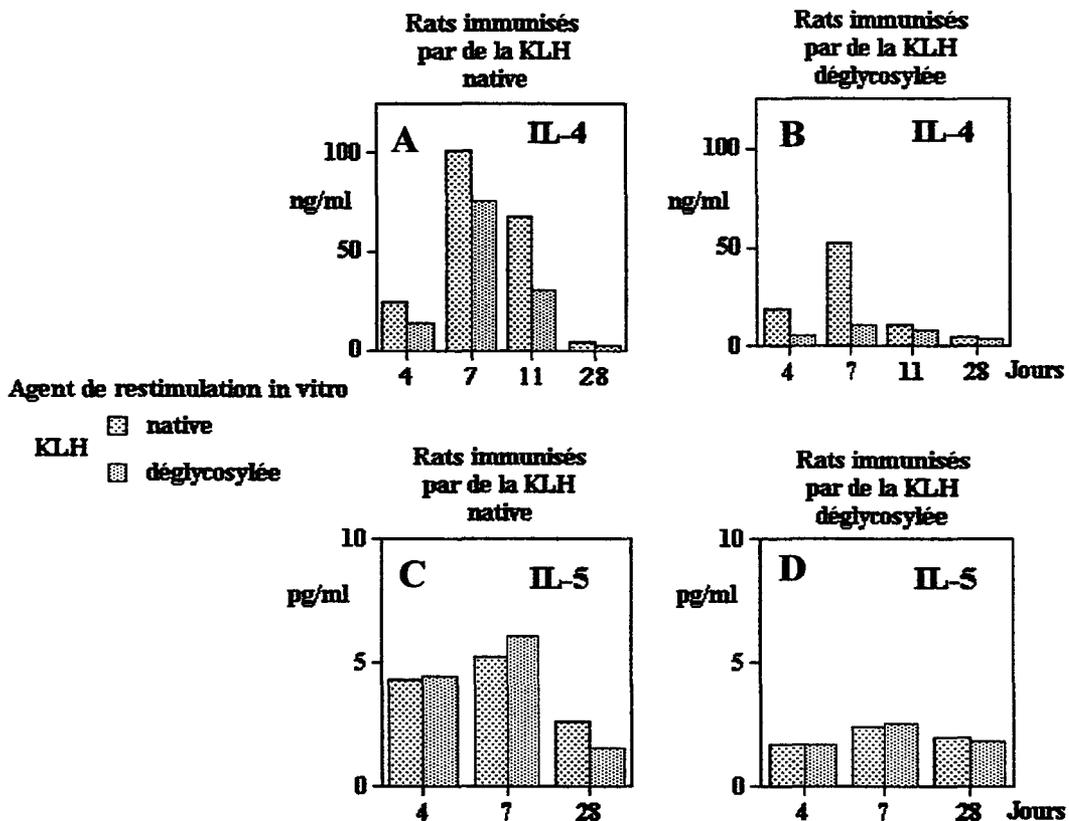
Ces valeurs moyennes de densité optique sont obtenues à partir des sérums (dilués au 1/1000 et au 1/2000) de 3 rats par point de cinétique, testés en ELISA pour leur spécificité vis-à-vis de la KLH. Ces résultats sont représentatifs de 2 cinétiques réalisées après immunisation par 50µg de KLH native ou déglycosylée, chez le rat FISHER.

2.3.3. Réponse cellulaire

Les anticorps spécifiques d'interleukines de rat étant limités, nous avons restreint notre étude à la recherche de l'IFN- γ , IL-5 et l'IL-4 produites au niveau de la rate. Les splénocytes de rat ont été mis en culture à 4, 7, 11 et 28 jours après immunisation. Les antigènes de stimulation sont respectivement la Con-A (concanavaline A), la KLH native ou déglycosylée.

Sous l'effet de la Con-A, nous avons pu stimuler la production de chacune de ces cytokines.

Expression protéique de l'IL-4 et de l'IL-5 suite à la restimulation *in vitro* par de la KLHn ou de la KLHd, de splénocytes de rats immunisés par l'un de ces antigènes



Analyse de la production de cytokines par les splénocytes totaux de rats FISHER sains ou immunisés par de la KLH native ou déglycosylée par IP. Les cellules de la rate, collectées aux différents points de cinétique après l'immunisation, sont stimulées *in vitro* avec un mitogène (Con-A) ou l'antigène natif ou déglycosylé. Elles sont mises en culture par pool de 2 rates pour chaque groupe d'animaux immunisés ou sains.

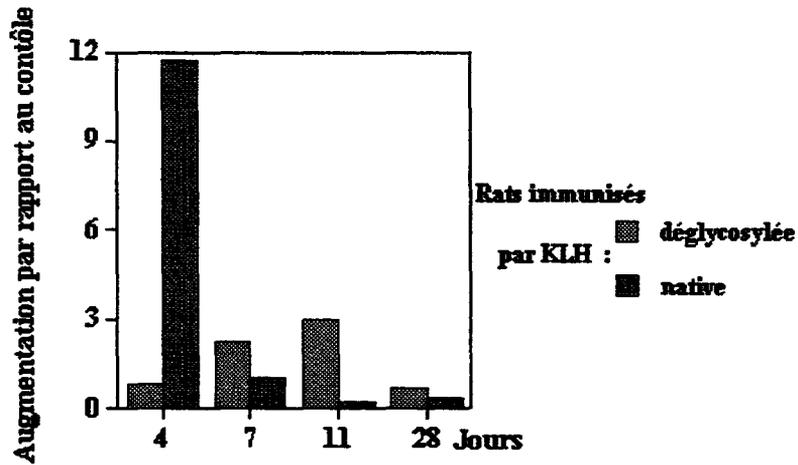
Les différences observées dans la production d'IL-4 entre les rats immunisés par la KLH native ou déglycosylée semblent les plus remarquables. En effet, une sécrétion significative d'IL-4 est observée à j7 et j11 au niveau des splénocytes des rats immunisés par de la KLH native (A), que ce soit en réponse à la stimulation par l'antigène global ou l'antigène déglycosylé. La déglycosylation de l'antigène de stimulation a cependant pour effet de diminuer le taux d'IL-4 induit (de manière significative à j7 et j11) (B). Comparativement, les splénocytes des rats immunisés par la KLH déglycosylée produisent également de l'IL-4, à moindre taux (50 contre 100 ng/ml) et uniquement à j7, et uniquement en réponse à la stimulation par de KLH native.

Les splénocytes des rats immunisés par de la KLH native produisent de faibles taux d'IL-5 (de l'ordre de 5 pg/ml) indifféremment en réponse à la stimulation par la molécule entière ou privée de sa partie glycanique (C). Comparativement les rats immunisés par la KLH déglycosylée produisent des taux inférieurs d'IL-5 (D).

La production d'IFN- γ détectée dans nos conditions expérimentales ne s'est pas avérée significative.

Aucune détection de cytokines IL-12 et IL-10 n'a pu être réalisée dans les tests d'immunocapture que nous avons mis au point à partir des IgG précipitées, préparées à partir de sérums polyclonaux anti-IL-12 ou anti-IL-10 recombinantes, malgré la bonne sensibilité de détection de nos dosages (1.6 ng/ml).

Ces résultats sont à corrélés avec l'analyse de la production des cytokines IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 et IFN- γ . Cette analyse a été réalisée par la technique de RT-PCR semi-quantitative à partir de l'ARNm extrait des rates de ces animaux immunisés avec de la KLH native ou de la KLH déglycosylée (cf conditions dans le § 1.2.1 précédent). Seule une production significative d'IL-4, a pu être mise en évidence dès le 4^e jour après l'immunisation par de la KLH native, en terme d'augmentation par rapport au contrôle.



Expression d'ARNm d'IL-4 au niveau de la rate de rats immunisés par la KLH native ou déglycosylée.

Quantification de l'expression de l'ARNm de l'IL-4 au niveau de la rate de 2 rats immunisés par de la KLH native ou déglycosylée, pour chaque point de cynétique. Son taux est évalué par RT-PCR (cf §2.1.3 du Matériel et Méthodes). Ces résultats sont présentés en augmentation par rapport au contrôle : une augmentation supérieure à 2 fois le contrôle est considérée significative.

Partie II :

***Construction d'un fragment anticorps
anti-idiotype mimant un épitope carbohydate
protecteur du parasite S. mansoni***

Bien que de nombreux exemples illustrent l'utilisation potentielle des anticorps anti-idiotypes en tant que vaccins à visée prophylactiques et thérapeutiques, leur application pratique reste limitée. Plus récemment, les outils de la biologie moléculaire ont permis d'envisager une nouvelle exploitation de ces anticorps anti-idiotypes. En effet, la construction génétique d'un fragment anticorps, codant pour les régions variables d'anticorps anti-idiotype, s'est révélée capable de mimer l'épitope antigénique d'origine, en induisant notamment une immunité spécifique voire protectrice. Constantin A. Bona évoque très bien cette idée dans l'article de Nature Medicine de juin 1998, en qualifiant les vaccins idiotypiques ainsi : « Forgotten but not gone »...

La seconde partie de nos travaux s'inscrit dans cette nouvelle approche idiotypique. L'originalité de notre étude réside dans la nature carbohydrate de l'épitope antigénique considéré, porté par la glycoprotéine de 38kDa de *S. mansoni*, et protecteur dans une infection par le parasite.

1. Clonage moléculaire des régions variables

1.1. Obtention de l'ADNc des régions variables

Afin d'obtenir les chaînes lourdes et légères de l'anticorps anti-idiotype d'intérêt, nous avons isolé son ARNm à partir de l'hybridome produisant l'anticorps monoclonal Ab2 (JM7-56-AH6 ou JM8-36BF4). L'ADNc a été produit par RT-PCR en présence d'oligo-dT. Purifié, il a été prolongé côté 5' à l'aide de dGTP grâce à une enzyme terminale transférase. Après une seconde étape de purification, cet ADNc a été utilisé comme matrice pour des réactions séparées d'amplification par PCR à l'aide des oligonucléotides suivants (cf § 2.3.1. du Matériel et Méthodes) :

oligo-dG + CH1 (choisi dans la région constante de la chaîne lourde)

oligo-dG + C κ (choisi dans la région constante de la chaîne kappa)

oligo-dG + C λ (choisi dans la région constante de la chaîne lambda)

Deux fragments ont été observés aux poids moléculaires attendus sur gel d'électrophorèse : ces produits de PCR correspondaient bien aux chaînes lourde (H) et légère (L) de l'anticorps anti-idiotype, avec plus précisément pour la chaîne légère, une identité avec la chaîne C λ 2 de rat. Les fragments ont été sous-clonés en vecteur PCRTMII, puis séquencés. Les séquences nucléotidiques et en acides aminés déduits des régions variables des chaînes lourde et légère sont représentées ci-dessous, avec les régions CDR surlignées pour chacune de ces chaînes.

Le séquençage d'une dizaine de clones démontrent l'absence de mutation au niveau des régions variables.

La page suivante illustre les séquences nucléotidiques et en acides aminés déduits pour la chaîne lourde et la chaîne légère.

Les régions CDR sont présentées en couleur. La présence des guanidines est expliquée par l'action en 5' d'une terminale transférase en présence de dGTP.

CHAINE LOURDE

GGGGGGGGGGGGGGAAACAACATATGCTCAGTCCTCCCCTGAACACAATAACTAACCATGGAATG
M E W
GAACTGGGTCTTTCTCTTCTCCTCTGTGTAAGTGCAGAAAGTCCACTCCCAGGTCCAGTGCAGCA
N W V F L F L L S V T A E V H S Q V Q L Q Q
GTCTGGAGCTGAGCTGGCAAAGCCTGGCTCTTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTACAC
S G A E L A K P G S S V K I S C K A S G Y T
CTTCACCAGCTACTATATAAGCTGGGTAAAGCAGAGGACTGGAGAGGGCCTTGAGTGTCTTGGATA
F T S Y Y I S W V K Q R T G E G L E C L G Y
CDR1
TATTAATACGGGAAGTGGAGGTAATACTACAATGAGAACTTCAAGGGCAAGGCCACATGACTGT
I N T G S G G T N Y N E N F K G K A T L T V
CDR2
AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTTCATGCAACTCAGCAGCCTGACACCTGACGACTCTGCGGTCTA
D K S S S T A F M Q L S S L T P D D S A V Y
TTACTGTGCAAGAGGTGCACAACCTGGGCTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTC
Y C A R G A Q L G F D Y W G Q G V M V T V S
CDR3
CTCAGAGAGTCAGTCCTCCCAACTGTCTTCCCCTCGTCTCCTGCGAGAGCCCCCTGTCTGATGA
S E S Q S S P T V F P L V S C E S P L S D E
GAATTTGGTGGCCATGGGCTGCCTGGCCCCGGGACTTCTGCCAGCTCCATTTCTCTC
N L V A M G C L A R D F L P S S I S F

CHAINE LEGERE

GGGGGGGGGGGGGGTTCATTGTACTTAGGAAGCAAATCTGAGTGTCTCACCATGACATGGACT
M T W T
CTACTGTTCCCTTGCCCTTCTTCACTTAACAGGTTCATGTGCCAGGCTGTCTTGCGCACCGA
L L F L A F L H H L T G S C A Q A V L A H R
AACTCTGTGTCTACGTCTCTAGGAGGCACGGTCAAACCTGTCTTGCACACTCAGCTCTGGTAACATA
N S V S T S L G G T V K L S C T L S S G N I
CDR1
GACAGCAACTATGTGCACTGGTACCAGCAGTATGAGGGGAGGTCACCCACCCTATGATTTATAAT
D S N Y V H W Y Q Q Y E G R S P T T M I Y N
GATGATAAGAGACCGGATGGTGTCCCCGACAGGTTCTCTGGCTCCATTGACAGCTCTTCCAACCTCA
D D K R P D G V P D R F S G S I D S S S N S
CDR2
GCCTTCTGACAACTCAAGACTGTGGAAATTGAAGATGAAGCCAGCTACTTCTGTCTATTCTTATGTT
A F L T I K T V E I E D E A S Y F C H S Y V
CDR3
AGTGGCATGTATCTTTTCGGCGGTGGAACAACGCTCACTGTCTTAGGTCAGCCCAAGTCCACTCCC
S G M Y L F G G G T T L T V L G Q P K S T P
ACACTCACAGTATTTCCACCTTCAACTGAGGAGCTCCAGGGAAACAAAGCCACACTGGTGTGTCTG
T L T V F P P S T E E L Q G N K A T L V C L
ATTTCTGATTTCTTCCGAGTGATGTGGAAGTGGCCTGGAAGGCAAATGGTGCCCTATCTCCCAG
I S D F F P S D V E V A W K A N G A P I S Q
GGTGTGGACACTGCAAATCCCACCAAACAGGGCAACAAATACATCGCCAGCAGCTTCTTACGTTTG
G V D T A N P T K Q G N K Y I A S S F L R L
ACAGCAGAACAGTGGAGATCTCGCAACAGTTTTTACCTGCCAAGTTACACATGAAGGGAACTGTG
T A E Q W R S R N S F T C Q V T H E G N T V
GAGAAGAGTCTGTCTCCTGCAGAGTGTGTC
E K S L S P A E C V

1. 2. Homologies

L'alignement des séquences nucléotidiques avec les séquences présentes dans la banque de données Genbank confirme qu'il s'agit bien d'une immunoglobuline. La banque de données NRBF-PIR référant les protéines connues montre une homologie importante avec les immunoglobulines humaines, murines et de rat.

Ainsi, la séquence peptidique présumée dérivant de l'ADNc obtenu présente les identités suivantes :

- pour la chaîne lourde:

71% avec celle de l'immunoglobuline humaine et murine (soit 136 acides aminés)

(Liu *et al.*, 1987)

77% avec celle de l'IgM murine (soit 117 acides aminés) (Comner *et al.*, 1994)

- pour la chaîne légère :

80% avec la région variable de la chaîne λ de rat (en position 1-124)

(Aguilar *et al.*, 1992)

99% avec la région constante de la chaîne λ de rat (en position 131-234)

(Frank et Gutman, 1988)

L'anticorps anti-idiotypé cloné comprend donc une chaîne légère λ et non κ .

L'identité obtenue avec la chaîne lourde et les chaînes lourdes humaines et murines démontre bien que la majorité de la spécificité est portée par cette chaîne.

1.3. Construction d'un simple fragment variable (ou sFv) recombinant

1.3.1. Différentes constructions

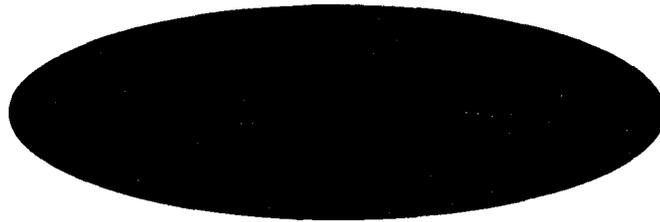
Nous avons utilisé les résultats de séquence obtenus afin de produire un sFv recombinant. Les régions variables des chaînes lourdes et légères ont été amplifiées séparément en utilisant différents types d'oligonucléotides (cf § 2.3.1. du Matériel et

Méthodes) : oligonucléotides de liaison ($\mu 5$) et CH1 pour la chaîne lourde ; $\lambda 8$ et $\lambda 3$ pour la chaîne légère. Chacun des produits de PCR a été purifié, puis digéré par l'enzyme de restriction *XhoI* ; enfin ils ont été liés entre eux afin de fusionner les deux chaînes. Le produit de ligation obtenu a été alors amplifié à l'aide des oligonucléotides $\lambda 3$ et $\mu 3$. Ce fragment a été sous-cloné en vecteur d'expression dans les sites *EcoRI* et *SmaI*.

Schématisation de la stratégie de construction d'un fragment simple chaîne des régions variables à partir de l'anticorps anti-idiotypique Ab2 .

V_H : région variable de la chaîne lourde / V_L : région variable de la chaîne légère

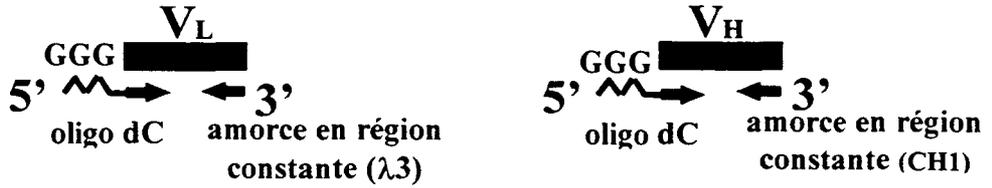
Extraction de l'ARN



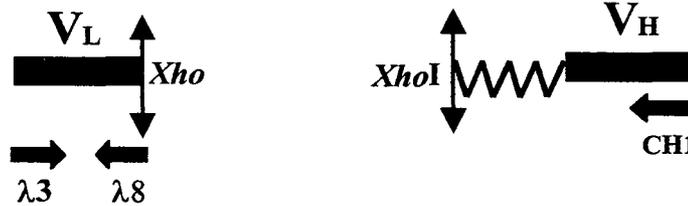
Purification de l'ADNc

↓ RT-PCR

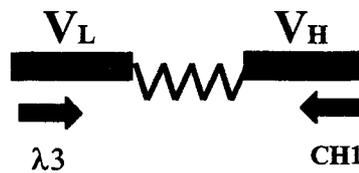
↓ 5' Tailing



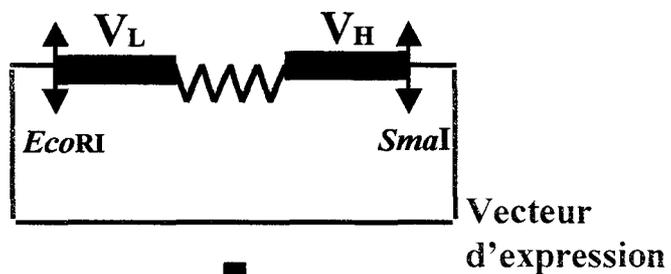
↓ PCR-Linker



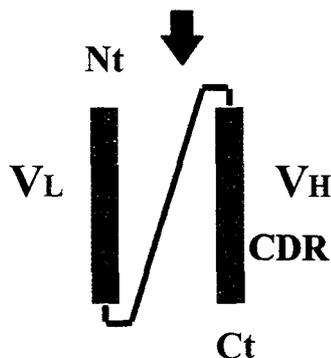
↓ Ligation



↓ Amplification et sous-clonage

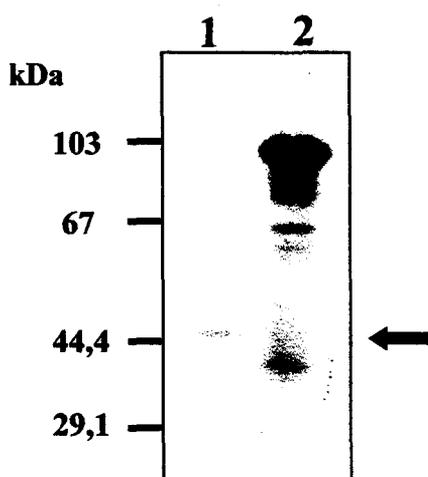


single Fragment variable (sFv)



1.3.2. Transcription-Traduction *in vitro*

Le fragment précédemment obtenu a été testé en système de transcription-traduction *in vitro*. Le résultat après traduction en présence de méthionine marquée au ^{35}S est présenté sur le gel d'acrylamide suivant. On observe donc une bande aux environs de 45 kDa correspondant à la traduction de notre «mini-anticorps» ou sFv. Cette construction étant correcte, nous l'avons utilisée comme construction de départ pour les différentes stratégies d'expression de l'anticorps recombinant.



Analyse en SDS-PAGE du produit de transcription-traduction *in vitro* réalisée avec (1) notre construction, et (2) témoin positif de transcription.

2. Expression de l'anticorps sFv recombinant

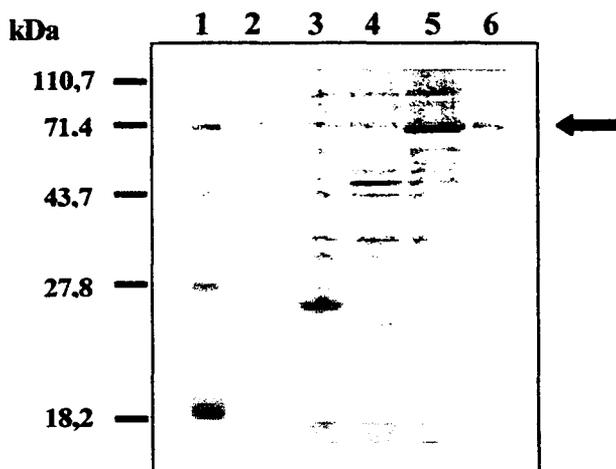
2.1. Système bactérien

2.1.1. Différents vecteurs d'expression

Plusieurs vecteurs d'expression ont été utilisés dans le but d'obtenir une protéine recombinante. Que ce soit dans les vecteurs pGEX- 4T3 ou pQE 30 pour l'une ou l'autre des constructions exprimées, la protéine recombinante se trouvait dans les corps d'inclusion de la bactérie, ce qui a nécessité une solubilisation en conditions dénaturantes, et une

renaturation de la protéine recombinante par dialyses séquentielles, en présence de SDS 0,02% dans la dernière étape.

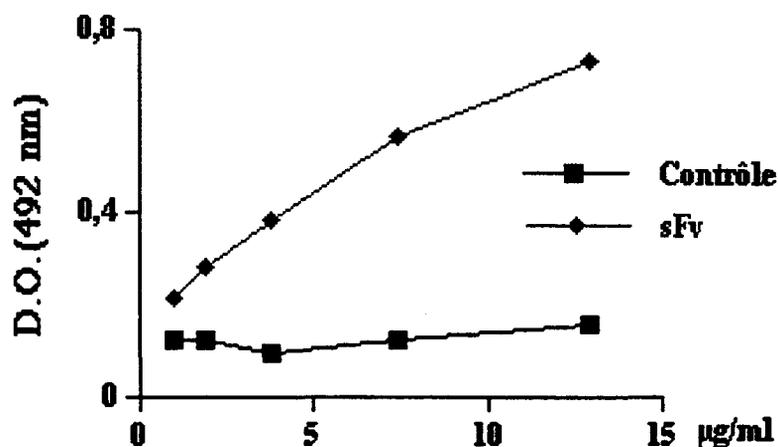
La figure suivante représente un SDS-PAGE de la protéine recombinante exprimée chez *E. coli* en vecteur PGEX-4T3 : pure (piste 6), elle migre environ à 71kDa.



Analyse en SDS-PAGE de l'expression du sFv en vecteur pGEX-4T3. (1) poids moléculaires (GIBCO-BRL) ; (2) culture bactérienne non induite ; (3) culture bactérienne induite par l'IPTG ; (4) culture bactérienne induite par IPTG contenant pGEX seul ; (5) culture bactérienne induite par IPTG contenant la protéine de fusion ; (6) protéine recombinante purifiée.

2.1.2. Conservation du site de liaison à l'antigène

Il était essentiel de vérifier que les traitements dénaturants précédemment évoqués n'altèrent pas la structure tridimensionnelle de l'anticorps recombinant et tout particulièrement son site de liaison à l'antigène. Plusieurs lots de ce même anticorps ont été produits dans cette optique. Il a été possible pour l'un d'entre eux d'obtenir une liaison à l'IPLSm1 dans des conditions satisfaisantes.



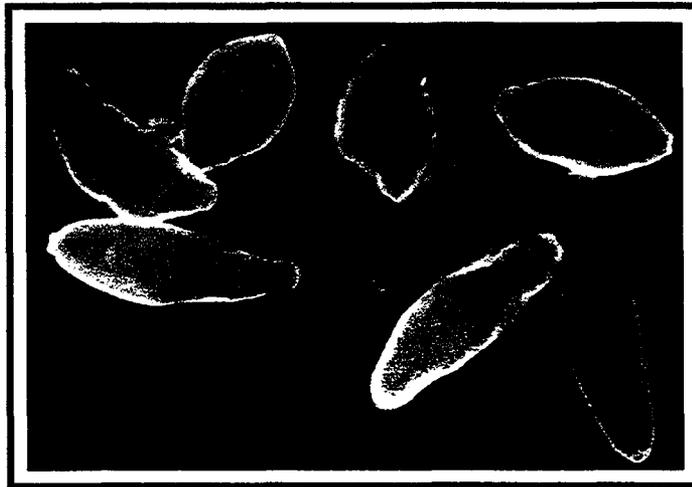
Liaison du sFv à l'IPLSm1(anticorps Ab1).

Les puits sont sensibilisés avec différentes concentrations de sFv et sont incubées avec l'anticorps Ab1 biotinylé, révélé ensuite à la streptavidine peroxydase. La protéine GST seule est utilisée comme contrôle négatif.

2.1.3. Immunisations

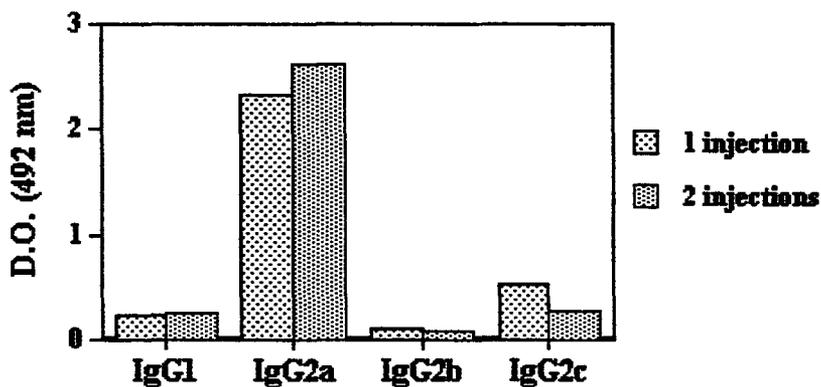
Avec le lot de cette protéine recombinante qui présentait une structure biologiquement fonctionnelle, plusieurs immunisations ont été réalisées chez le rat FISHER, à raison de 200µg en présence de CFA ; des immunisations témoins ont été réalisées parallèlement avec du CFA-GST ou du CFA seul.

Le sérum d'un seul rat s'est révélé positif vis-à-vis de l'antigène mimé par notre anticorps anti-idiotype recombinant, à savoir l'épitope glycanique porté par la glycoprotéine de 38 kDa de *S. mansoni*. En effet, par marquage immunofluorescent, nous avons pu montrer que ce sérum était capable de reconnaître la surface de schistosomules:



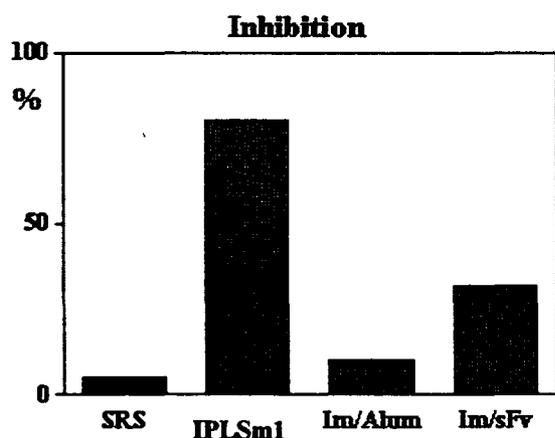
Marquage immunofluorescent de la surface de schistosomules par un sérum de rat (1/100) immunisé avec le sFv recombinant exprimé en E. coli.

L'analyse des isotypes de ce sérum positif révèle la présence majoritaire d'IgG2a, et d'IgG2c à moindre taux. Une seconde injection de protéine recombinante augmente également le taux d'IgG2a.

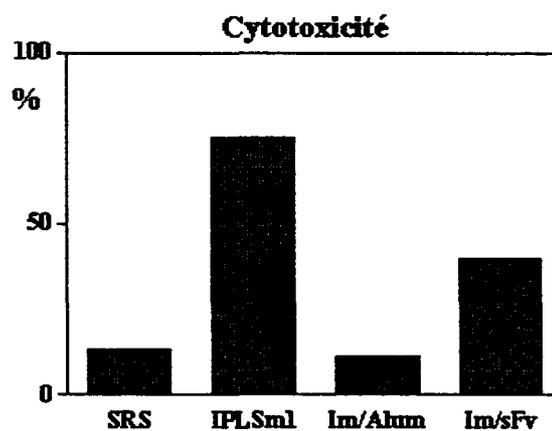


Profil isotypique spécifique de la KLH des sérums de rat immunisé (à 4 semaines d'intervalle) par le sFv exprimé en système bactérien

Des tests d'inhibition ont été réalisés avec ces sérums et montrent que, dilués au 1/50^e, ils sont capables d'inhiber la fixation de l'anticorps IPLSm1 à la KLH. Parallèlement, l'étude de leur cytotoxicité révèle une mortalité de 40% des schistosomules 48 heures après l'incubation de ces sérums.



Inhibition de fixation de l'IPLSm1 sur la KLH par des sérums de rat immunisés par le sFv (Im/sFv) ou par de l'adjuvant seul (Im/Alum)



Cytotoxicité dépendante d'éosinophiles vis-à-vis de schistosomes de *S. mansoni*

Devant la difficulté à obtenir différents lots d'anticorps recombinant correctement replié dans leur conformation tridimensionnelle, nous avons procédé à l'investigation d'autres systèmes d'expression, notamment chez les eucaryotes. Notre but est de pouvoir optimiser le nombre d'animaux susceptibles de répondre à l'immunisation de cette protéine recombinante, dans la perspective d'études ultérieures fondamentales, et d'études protection vis-à-vis d'une infection par *S. mansoni* (qui nécessite un certain nombre statistique d'animaux).

2.2. Cellules mammifères

La stratégie de vaccination génique nous a semblé être un bon moyen pour biaiser les problèmes rencontrés lors de l'expression de protéines recombinantes en système bactérien classique. Pour cela, nous avons sous-cloné l'ADNc codant pour les chaînes variables de l'anticorps anti-idiotype dans un vecteur pRc-CMV qui possède l'origine de réplication du promoteur du virus Simien SV-40.

Des transfections transitoires en cellules Cos-1, surtransfectées avec le promoteur du SV-40, auraient du permettre une production importante de protéine recombinante. Toutefois, les analyses réalisées par différentes techniques d'immunocapture en ELISA, de western blot et de marquage immunofluorescent, n'ont pas révélé de production significative au niveau du surnageant de culture des cellules, ni dans leur lysat.

2.3. Cellules d'insectes

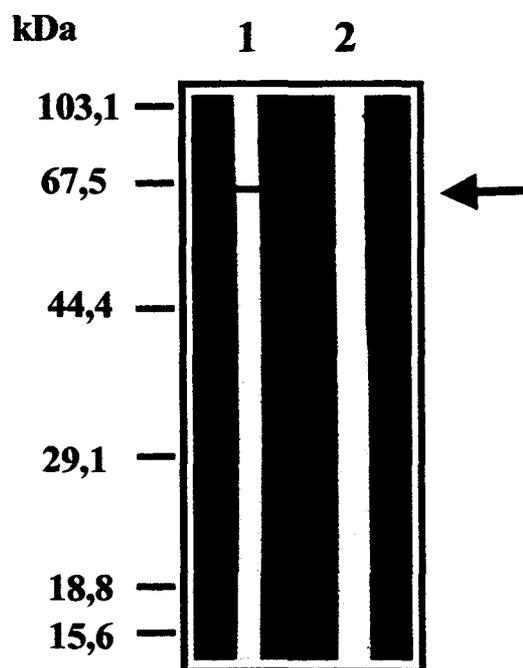
Le système d'expression en baculovirus (décrit dans le § 2.4.2. du Matériel et Méthodes) s'est présenté comme une alternative d'autant plus intéressante que la littérature rapportait divers exemples concernant l'expression d'anticorps monoclonaux, même s'ils sont encore limités (Putlitz et al, 1990; Hasemann et al, 1990; Nesbit et al, 1992; Carayannopoulos, 1994). Non seulement l'anticorps simple chaîne exprimé s'avérait biologiquement actif dans ce système (Bei et al, 1995; Kretzschmar et al, 1996), mais il a été également possible d'assembler correctement des chaînes lourdes et légères d'immunoglobuline grâce à une «co-expression» des gènes correspondants. Nous avons opté pour l'expression de la construction entière dans ce système.

2.3.1. Construction du virus recombinant

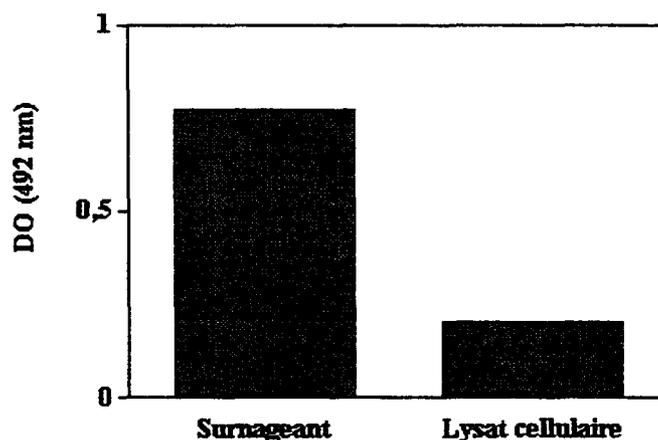
Nous avons donc construit un virus recombinant selon la procédure précédemment décrite (cf § 2.4.2. du Matériel et Méthodes), en insérant notre sFv sous forme d'ADNc, au niveau du locus polyédrique du baculovirus.

2.3.2. Détection du sFv recombinant

La figure suivante représente une analyse en western blot qui indique la présence du sFv recombinant dans le surnageant de culture par rapport aux cellules saines.



Analyse en western blot de l'expression du sFv recombinant par les cellules d'insectes HF. Immunoréactivité du sérum polyclonal(1/500) sur un surnageant de cellules transfectées d'insectes (1) et un surnageant de cellules saines (2).



Production du fragment sFv recombinant en culture de cellules d'insectes (Sf9), après 3 jours d'infection par baculovirus, analysée par test d'immunocapture

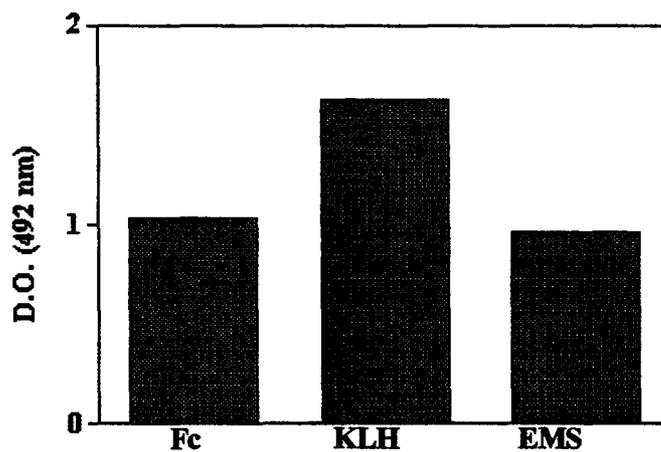
La protéine recombinante s'avère présente au niveau du surnageant de culture, mais également au niveau intracellulaire malgré le système d'excrétion optimisé dans la construction du vecteur navette.

Différents types d'ELISA (par adsorption directe de la protéine produite ou par immunocapture) ont été réalisés afin de caractériser la conformation correcte du fragment sFv. Dans la mesure où les surnageants des cellules saines adsorbés directement produisaient un bruit de fond non négligeable, seul le test d'immunocapture réalisé entre l'anticorps polyclonal de lapin (produit initialement contre la protéine totale d'origine bactérienne) et l'anticorps monoclonal IPLSml (anticorps Ab1) a permis de confirmer un repliement tridimensionnel correct du sFv et sa capacité à mimer l'épitope glycanique protecteur.

Notons cependant qu'associée à l'expression de notre protéine recombinante, une production non négligeable de GST libre apparaissait. Nous avons donc procédé à la digestion de notre protéine de fusion à la thrombine, puis à sa purification sur billes de glutathion bien que la conséquence en soit une diminution du rendement.

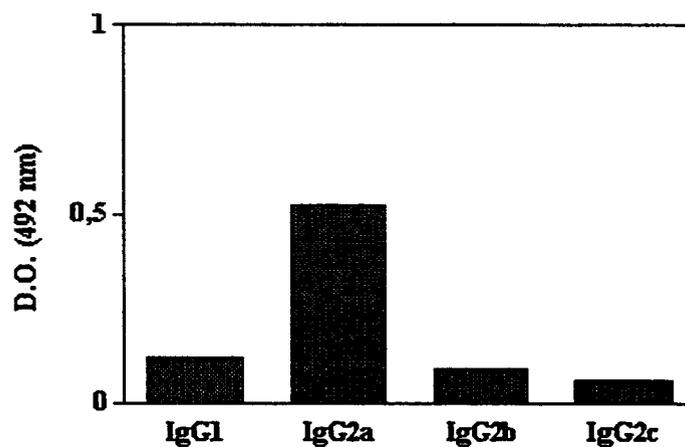
2.3.3. Immunisations

Six rats mâles FISHER de 6 semaines ont été immunisés à raison de 250µg de protéine recombinante par la technique de Vaitukaitis, puis rappelés 3 semaines après par voie sous-cutanée. Tous ces animaux se sont révélés immuns, mais seuls 2 rats présentaient des réactivités spécifiques de la KLH, d'antigène de furcocercaire, ou d'antigènes de surface du schistosomule contenant la glycoprotéine de 38 kDa.



EMS : Extrait membranaire de schistosomules (gp38 majoritaire)
 KLH : Keyhole Limpet Haemocyanine
 Fc : Furcocercaire

Spécificité antigénique des sérums des rats immunisés par le sFv exprimé dans le système baculovirus/cellules d'insectes



Isotypes spécifiques de l'antigène furcocercaire des sérums de rats immunisés pas le sFv exprimé dans le système baculovirus/cellules d'insectes

L'analyse des isotypes des sérums positifs révèle la présence majoritaire d'IgG2a.

Cependant, au vu du faible nombre d'animaux répondant spécifiquement vis-à-vis de l'antigène d'origine, aucune expérience de protection n'a été entreprise.

MATERIEL
ET
METHODES

1. Matériel

1.1. Parasites

Une souche guadeloupéenne de *S. mansoni* est maintenue au laboratoire par passages successifs sur des mollusques *B. glabrata*, hôtes intermédiaires élevés dans de l'eau minérale (Société des Eaux de Volvic, France) et sur des souris OF1 en tant qu'hôtes définitifs.

1.2. Animaux

Les rats utilisés dans nos expériences sont majoritairement des rats mâles FISHER F344 (Iffa Credo, France), âgés de 6 à 8 semaines, sinon des rats LouM (élevage de l'Institut Pasteur de Lille).

1.3. Antigènes

SEA : Les œufs sont récoltés à partir d'homogénats de foie de hamsters infectés depuis 40 jours. Ils sont centrifugés, lavés plusieurs fois en milieu Hank's Wallace jusqu'à l'obtention d'un culot propre, congelés, puis homogénéisés par une dizaine de passages dans une X-Press (A.B. Biox, Suède) permettant l'éclatement de la coque. La suspension obtenue est alors centrifugée pendant 15 minutes à 10 000g. Le surnageant constitue l'antigène SEA. La concentration protéique est évaluée par la méthode BCA (Pierce, BCA protein assay, IL USA).

KLH : Elle est commercialisée par Calbiochem-Novachem Corporation (CA, USA) ou par Pierce (IL USA).

FC : Les antigènes solubles de cercaires sont préparés à partir de cercaires lavées dans du PBS à 4°C, dispersées par sonication pendant 15 minutes à 10 000g.

1.4. Souches bactériennes et cellulaires

Noms		Caractéristiques
Bactéries	JM 109	<i>E.coli</i> e14 ⁻ (mcrA), rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hsd R17 (r _k ⁻ , m _k ⁺), sup E44, rel A1 D(lac-pro AB), [F ⁺ tra D36, pro AB, lac I ^q ZΔM15]
	M 15	[pREP4]: NaIs Strs Rifs lac- ara- gal- mtl- f-recA ⁺ uvr ⁺ .
Cellules de mammifères	COS - 1	Lignée de rein de singe vert d'Afrique, transformée par le SV40. ATCC CRL - 1650
Cellules d'insectes	SF 9	Lignée dérivée d'ovaires (Ovary, fall armyworm) de <i>Spodoptera frugiperda</i> . ATCC CRL-1711.
	High Five™	Lignée dérivée d'œufs de <i>Trichoplusia ni</i> . BTI-TN-5B1-4.

1.5. Vecteurs

Types	Noms	Caractéristiques
Vecteurs d'expression	pGEX-4T3 (Pharmacia)	Expression en système procaryote. Vecteur d'expression de protéine fusionnée à la Sj26GST, purifiée sur glutathion.
	pQE 30 (Qiagen)	Expression en système procaryote. Vecteur d'expression de protéine fusionnée à 6 histidines (Qiagen), purifiée par chromatographie de résine de chélate chargée en Nickel (Qiagen).
Vecteur pour séquençage	PCR TM II (TA Cloning, Invitrogen)	Sous-clonage direct de fragments obtenus par PCR
Vecteur ubiquitaire	pRc/CMV (In vitrogen)	Expression en système eucaryote.
Vecteur de transfert	pAc GP67 (Pharmingen)	Expression en système eucaryote. Vecteur contenant la séquence conduisant à la sécrétion de la GP67 en amont du site de clonage. Expression de la protéine fusionnée à une GST sous dépendance du promoteur de la polyédrine du baculovirus.

2. Méthodes

2.1. Etude de la réponse IgA muqueuse

2.1.1. Immunisations et prélèvements

Les œufs de *S. mansoni* sont récoltés à partir de foies de souris OF1 infectées depuis 40 jours. Après avoir retiré la vésicule biliaire et les veines, ces foies sont homogénéisés, conservés sur glace et filtrés sur gaze. Les œufs ainsi obtenus sont lavés 4 fois en Hank's Wallace par centrifugation successive pendant 5 minutes à 1500g. Finalement, les œufs sont filtrés sur blutex (numéro 8, Tripette et Renaud, France) et remis en suspension à raison de $2.5 \cdot 10^4$ /ml en PBS stérile.

Les rats sont injectés par voie intra-veineuse avec 5000 œufs vivants dans 200µl de PBS ; les animaux contrôles reçoivent seulement 200µl de PBS.

Les lavages broncho-alvéolaires (LBA) et sérums sont collectés à différents temps après l'injection d'œufs, à raison de 2 animaux injectés et un rat témoin par point. Anesthésiés à l'éther, ces animaux sont saignés au niveau du sinus rétro-orbital, puis sacrifiés par dislocation cervicale. Les échantillons sériques sont aliquotés et stockés à -20°C. Les poumons sont lavés à partir de la trachée avec 2 ml de PBS stérile. Les LBA sont centrifugés à 10 000g pendant 10 minutes. Les surnageants obtenus, additionnés de 1 mM de PMSF, sont stockés à -20°C.

2.1.2. ELISA : étude de la réponse humorale sérique et muqueuse

Afin de détecter les anticorps spécifiques, des tests ELISA ont été réalisés sur des immuno-modules Nunc (Danemark) adsorbés 3 h à 37°C, avec 100µl d'une solution de SEA à 5µg/ml en PBS. Après un lavage avec du PBS-Tween-20 0.1% (Prolabo, France) (PBS-T), les plaques sont saturées 1 h à température ambiante avec 200µl/puits de PBS-gélatine 0.5% (porc de type A, Sigma, MO USA) et sont lavées à nouveau 3 fois en PBS-T. Les échantillons sont dilués (en PBS-T de 1/50 à 1/5000 pour les sérums, et pour les LBA à 1/5 et 1/10), incubés une nuit à 4°C (100µl/puit). Après 3 lavages en PBS-T, les plaques sont alors incubées avec un anticorps de souris couplé à la peroxydase anti-IgM, IgG1, IgG2a, IgG2c de rat (respectivement MARM-4 à 1/20 000 ; MARG1 à 1/8000 ; MARG2a à 1/8000 ; MARG2c à 1 :4000, Bazin, Belgique) (100µl/puit) pendant 90 minutes à 37°C. Après 3 lavages avec du PBS-T, les plaques sont révélées avec le substrat OPD (ortho-phényldiamine, Sigma) à 1mg/ml dilué en tampon acide citrique 0.05 M-Na₂HPO₄ 0.1 M pH 5.5 pendant 30 minutes à 37°C. Cent microlitres d'acide chlorhydrique 2N sont ajoutés par puits avant de lire les densités optiques sur un lecteur de plaque (Titertek Multiskan, Finlande) à 492 nm.

Les IgA totales sont mesurées dans les mêmes conditions en adsorbant l'anti-IgA de rat à 5 µg/ml (MARA-2, Bazin, Belgique) en PBS. Les échantillons sont dilués en PBS-T (à 1/25 et 1/50 pour les sérums, et à 1/5 et 1/10 pour les LBA). Les plaques sont incubées avec 100µl par puits d'anti-IgA de rat biotinylée (MARA-1, Bazin, Belgique) à 1/2000 pendant 90 minutes à 37°C. Après 3 lavages, les plaques sont incubées avec de la streptavidine peroxydase (1/2000, Amersham, France), à raison de 100µl par puits pendant 30 minutes à 37°C. Après 5 lavages, le test est révélé avec le substrat OPD (1mg/ml). Le taux des IgA totales est évalué à partir de courbes standard obtenues avec un taux connu d'IgA de rat (IR22, Bazin, Belgique).

2.1.3. Etude de la réponse cellulaire *in vivo*

a) Isolement et purification des ARNm de cytokines

Afin de déterminer la cinétique d'apparition des cytokines au niveau des différents tissus, les ganglions périaortiques (PN), un lobe de poumon et un morceau de rate ont été prélevés à différents temps et immédiatement congelés en azote liquide. Les organes congelés ont été homogénéisés dans 1 ml de solution RNA PLUS™ (Bioprobe Systems, France). L'ARN total a été isolé par des étapes successives d'extraction, précipitations et lavages recommandées par le fournisseur. L'ARN est resuspendu dans de l'eau stérile Rnase

free. Le taux et la qualité des ARN ont été déterminés par la mesure de l'absorbance à 260nm et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

b) Réactions de Transcription inverse

Un protocole de RT-PCR a été déterminé afin d'évaluer les quantités relatives d'ARNm pour l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β , IFN- γ et la β -actine. Les réactions de transcription-inverse sont réalisées dans un volume final de 25 μ l contenant 0.5 μ g d'oligo dT et 2.5 μ g d'ARN total. Elles sont incubées pendant 5 minutes à 65°C, et leur sont ajoutés 1.2mM d'un mélange des 4 désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs), le tampon 1x de la transcriptase inverse (50mM Tris-HCl pH8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂), 10mM de DTT, 4 U de Rnase Inhibitor (Promega, USA) et 200 U de transcriptase inverse (Superscript™ II, Gibco BRL, USA). Les réactions incubent une heure à 37°C, et se prolongent par 3 minutes d'incubation à 92°C afin de dénaturer l'enzyme. Placés sur glace pendant 3 minutes, les tubes sont stockés à -20°C.

c) Réactions de PCR

Les séquences des amorces et des sondes utilisés pour l'IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , IL-6, TGF- β et la β -actine sont présentés dans le tableau suivant :

Cytokines	Séquences des amorces	Références
β -actine sens	5' - gCC ATC CTg CgT CTg gA - 3'	
β -actine anti-sens	5' - ggg gCA TCg gAA CCg CT - 3'	(Nüdel et al., 1983)
IFN- γ sens	5' - Tgg ATA TCT ggA ggA ACT gg - 3'	
IFN- γ anti-sens	5' - CgA CTC CTT TTC CgC TTC CT - 3'	(Dijkema et al., 1986)
IL-4 sens	5' - ATg ggT CTC AgC CCC CAC C - 3'	(Mac Knight et al., 1991)
IL-4 anti-sens	5' - AgA gAg ATC ATC AAC ACT TTg AAC C - 3'	
IL-5 sens	5' - ATg Agg ATg CTT CTg TgC TTg - 3'	
IL-5 anti-sens	5' - TCA gAC TTC CAT TgC CCA CTC - 3'	Genebank (DNASStar)
IL-10 sens	5' - AgC AAA ggC CAT TCC ATC Cg - 3'	
IL-10 anti-sens	5' - TCA ATT TTT CAT TTT gAg TgT CAC gTA ggC - 3'	Genebank (DNASStar)
IL-6 sens	5'-gTT CTC Agg gAg ATC TTg-3'	
IL-6 anti-sens	5'-CTg TgA CTC TAA CTT CTC-3'	Genebank (DNASStar)
TGF- β sens	5'-ACC CgC gAC Cgg gTg gCA-3'	
TGF- β anti-sens	5'-gAg TTC TAC gTg TTg CTC CAC-3'	Genebank (DNASStar)

Les conditions de réactions de PCR ont été définies pour chaque paire d'amorces de manière à conserver une relation linéaire entre les quantités d'ARN et les produits de PCR obtenus. Des contrôles positifs et négatifs sont inclus dans chaque réaction afin d'éviter toute contamination. Le mélange constitué pour les réactions de PCR contient 0.8mM de dNTPs, du tampon PCR 1x (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 1.5mM de MgCl₂, 20pmoles de chaque amorce sens et antisens, 2 μ l de cDNA et 1.25 U de Taq polymérase (AmpliTaQ Gold™, Perkin-Elmer, USA). Après une première étape de dénaturation pendant 10 minutes à 94°C, les cycles de température sont :

- 94°C pendant 1 minute, pour une **dénaturation** de la matrice double brin,
- le T_m spécifique, pour une **hybridation** de chaque couple d'amorces ou de chaque sonde, pendant 1 minute,
- 72°C pendant une minute, pour l'**élongation** du second brin d'ADN par l'enzyme ; ceci est réalisé grâce à l'appareil PTC 200 MJ (Prolabo, France).

d) Analyses et quantification des produits de PCR

Après un nombre préalablement déterminé de cycles de PCR, l'ADN amplifié est analysé par électrophorèse, Southern blot, et hybridation avec les sondes radioactives spécifiques de chaque cytokine. Dix microlitres de chaque réaction sont analysés sur gel d'agarose à 1%, visualisés par coloration au bromure d'éthidium, et transférés sur membrane Hybond-N (Amersham, Royaume-Uni). Les membranes sont fixées aux U.V. (0.15 J/cm²) préhybridées à 65°C pendant 1h30 dans un tampon saturant (5xSSC, Denhardt's 5x, ADN de sperme de hareng 100µg/ml, SDS 0.5%), et enfin hybridées avec la sonde marquée au ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP pendant une nuit à 60°C dans un tampon d'hybridation (SSC 5x, Denhardt's 5x, ADN de sperme de hareng 100µg/ml, SDS 0.5%). Dix picomoles d'oligonucléotides sont marqués au ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP grâce à la polynucléotide kinase du kit « Ready to Go T4 » (Pharmacia, Suède). La sonde est ensuite purifiée sur colonne (SéphadexTMG50, Pharmacia) afin d'éliminer les nucléotides marqués libres.

Cytokines	Séquences des sondes
β -actine	5' - CTg TgC TAT gTT gCC CTA gAC TTC gAg CAA - 3'
IFN- γ	5' - CTg gCT CTC AAg TAT TTT CgT gTT ACC gTC - 3'
IL-4	5' - gAg AAC CCC AgA CTT gTT CTT CAA gCA Cgg -3'
IL-5	5' - AgT TTg ATT CTT CAg TAT gTC TAg CCC CTg - 3'
IL-10	5' - ggC AAC CCA AgT AAC CCT TAA AgT CCT gCA -3'
IL-6	5' - ggA TAT AAC CAg gAA ATT TgC CTA TTg AAA ATC Tg - 3'
TGF- β	5' - gTT gTT gCg gTC CAC CAT TAg CAC gCg ggT - 3'

Les membranes radiomarquées sont lavées une fois en tampon 2x SSC-0.5% SDS à température ambiante, puis en tampon 2x SSC -0.1% SDS toujours à température ambiante et finalement en tampon 1x SSC-0.1% SDS à 65°C. Les membranes sont exposées sur film X-OMAT AR (Kodak, Sigma) à -80°C pendant au moins 2 h. L'intensité des spots autoradiographiques est évaluée par densitométrie grâce au programme ImageMaster-ID-Prime (Pharmacia, Suède). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation par rapport à l'absorbance contrôle.

2.1.4. Etude de la réponse cellulaire *in vitro*

a) Production des cytokines *in vitro*

Seules les cellules obtenues à partir du broyat de rate ont été placées en culture et stimulées par différents antigènes afin d'analyser la sécrétion d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-5. Les rates ont été prélevées à partir de rats sains, injectés en I.V. par des oeufs ou du PBS, ou encore immunisés par de la KLH native (KLHn) ou déglycosylée (KLHd) en fonction de l'expérience considérée. Brièvement, les cellules spléniques sont obtenues en broyant la rate sur blutex, puis lavées 3 fois en milieu RPMI 1640 (Gibco BRL, France) après une lyse des érythrocytes spléniques (en tampon Tris-Buffered saline 170 mM et NaCl 155 mM). La viabilité cellulaire est évaluée par exclusion au bleu trypan et 10⁷ cellules sont resuspendues dans 1 ml de milieu de culture contenant du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (JRH BioSciences, KS, USA), 50 mg/ml de gentamycine (Schering-Plough, France), 2 mM de Glutamine (Seromed, Allemagne), 1% d'acides aminés non essentiels (Seromed), 1 mM pyruvate de sodium (Sigma) et 5.10⁻⁵ M de β -mercaptoéthanol (Merck, Allemagne). Un millilitre de la suspension cellulaire est incubé seul ou en présence de Concanavaline-A (5 µg/ml, Seromed), de KLHn ou KLHd (50µg/ml), ou de SEA (10µg/ml) en fonction de l'expérimentation, dans des plaques de 24 puits (NunclonTM, Nunc, Danemark) à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les surnageants sont ensuite collectés à 24, 48 ou 72h en fonction de la cytokine à tester.

b) Sécrétion des cytokines

IL-4

La sécrétion de l'IL-4 a été évaluée par le kit "Biosource International cytoscreen™ rat interleukin-4", selon les conditions recommandées par le fabricant. Les valeurs obtenues pour la courbe standard sont comprises entre 7.8 et 500 pg/ml.

IL-5

Un test de prolifération cellulaire a été réalisé : la lignée de cellules B murines LyH7.B13, obtenue auprès du Dr. Fattah (GlaxoWellcome, GB) est dépendante de l'IL-5. Les cellules (5.10^4 /puit) sont mises en culture en tripliquette en DMEM (Gibco BRL, France) contenant 10% de SVF (JRH BioSciences, KS USA), 1% d'acides aminés non essentiels (Seromed) et 5.10^{-5} M de β -mercaptoéthanol (Merck) avec les surnageants à tester dilués en plaques de 96 puits (Falcon, Becton Dickinson, NJ USA). Après 72h de culture, 50 mg de MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) (Sigma) sont ajoutés à chaque puits et incubés pendant au moins 5 heures à 37°C dans une atmosphère avec 5% de CO₂. On ajoute ensuite 0.1 ml d'isopropanol-HCl 0.04N par puit et après homogénéisation, la coloration est mesurée par spectrophotométrie à 570 nm (Titertek Multiskan MCC/340, Finlande). Les concentrations d'IL-5 sont calculées en référence à des courbes standard réalisées avec des taux connus d'IL-5 purifiée recombinante (Genzyme, GB) dilués en milieu de culture. Ces valeurs sont comprises entre 15.62 et 5.10^3 mUI/ml.

IFN- γ

Des modules Nunc Immulon™ (Nunc, Danemark) sont adsorbés à 5 mg/ml avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-IFN- γ de rat (Biosource International, USA) pendant 3h à 37°C avec 100 μ l/puit (en tampon 0.1 M NaHCO₃, 0.1 M Na₂CO₃, pH 9.6). Après 3 lavages, les plaques sont saturées avec 200 μ l/puit de PBS-0.5% de gélatine pendant une heure à température ambiante. Après 3 lavages, les surnageants sont ajoutés et incubés une nuit à 4°C. Les plaques sont alors lavées en PBS-0.1% de Tween-20 et incubées pendant 90 minutes 37°C avec l'anticorps monoclonal biotinylé de souris anti-IFN- γ de rat (100 μ l/puits) (Biosource International, USA) dilué en PBS-0.1% de Tween-20 à 1 mg/ml. La révélation a lieu grâce au conjugué streptavidine-peroxidase (1/2000, Amersham, France). Après plusieurs lavages, 100 μ l de substrat (1mg/ml OPD (Sigma), 0.03% H₂O₂ en tampon citrate 0.1 M, pH 5.0) sont ajoutés par puits. La réaction est arrêtée par l'addition de 100 μ l d'HCl 2N. L'absorbance est mesurée à 492 nm. Les concentrations d'IFN- γ sont calculées en référence à des courbes standard réalisées avec des taux connus d'IFN- γ purifié recombinant (Biosource, USA). Les valeurs sont comprises entre 62.5 et 5.10^3 pg/ml pour l'IFN- γ .

IL-6 et IL-10

Les sécrétions de l'IL-6 et le l'IL-10 ont été évaluées par les kits "Biosource International cytoscreen™ rat interleukin-6/ interleukin-10", selon les conditions recommandées par le distributeur. Les valeurs obtenues pour la courbe standard sont comprises entre 0 et 2000 pg/ml pour l'IL-6 et entre 0 et 1000 pg/ml pour l'IL-10.

2.1.5. Cellules de LBA

Un comptage a été réalisé sur les culots cellulaires obtenus à partir des LBA, cyto centrifugés (2 min à 400rpm) puis colorés à l'éosine et au bleu de méthylène (réactifs RAL, kit 555, France).

2.1.6. Infestation expérimentale et perfusion

Les rats préalablement traités au Valium et endormis à l'Imalgène, sont infestés par voie transcutanée selon la technique des anneaux (Smithers & Terry, 1965) à raison de 1000 cercaires de *S. mansoni* (souche Guadeloupe) par rat. Les foies de ces animaux sont perfusés 21 jours après l'infestation, et les vers sont comptés par examen microscopique.

2.2. Etudes immunologiques de l'épitope glycanique commun à la glycoprotéine de 38 kDa et à la KLH

2.2.1. Etudes immunologiques de l'épitope commun

Test d'inhibition

Cette réaction d'inhibition compétitive est réalisée entre les anticorps monoclonaux IPLSm1 (marqués à l'iode par la technique à la chloramine T) et les fractions de KLH éluées sur colonne d'immuno-affinité. Une solution de KLH (10µg/ml) est déposée sur une plaque souple de microtitration (Falcon, CA USA) de polyvinylchloride (PVC) à raison de 100µl par puits, et incubée 2h à 37°C, puis une nuit à 4°C. Les puits sont ensuite saturés par 200µl d'une solution de sérum albumine bovine (BSA) à 1% en tampon PBS 0.1% BSA. Le potentiel inhibiteur des fractions de KLH est évalué par co-incubation de 50µl de solution de KLH (solution de référence, concentrations comprises entre 0 et 250µg/ml) avec 50µl d'une solution d'anticorps IPLSm1 marqué à l'¹²⁵I, pendant 1h à 37°C puis 12h à 4°C. Cette étape est suivie de 3 lavages en tampon PBS à 0.1% BSA et la radioactivité de chaque puits est déterminée au compteur gamma. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante : $100 \times (a-b) / a$, où *a* est le nombre de cpm sans inhibiteur, et *b* le nombre de cpm en présence d'inhibiteur. Afin d'augmenter la sensibilité de ce test, nous avons pu réaliser les mêmes expériences en parallèle, où cette fois les anticorps étaient immobilisés sur la plaque et la KLH marquée à l'¹²⁵I.

2.2.2. Déglycosylation de la KLH

Un échantillon de KLH Calbiochem est dissous en tampon d'acétate de sodium à 0.05M pH4.5, puis dialysé une nuit à 4°C. Dix millimolaires de métapériodate préparés dans le même tampon d'acétate de sodium, sont ajoutés pendant 1h dans l'obscurité à température ambiante (Woodward et al., 1985). La réaction est arrêtée par 50 mM de NaBH₄ pendant 30 minutes à température ambiante. L'échantillon est finalement dialysé en PBS.

2.3. Clonage moléculaire des régions variables

2.3.1. RT-PCR

L'ARNm a été obtenu à partir de $5 \cdot 10^6$ cellules des hybridomes JM7-56-AH6 ou JM8-36-BF4 selon la technique décrite précédemment (§ 2.1.3). De la même manière, l'ADNc a été produit par RT-PCR en présence d'oligodT.

Une queue d'oligoG est greffée en 5' par l'action d'une transférase (Gibco BRL, USA) pendant 1h à 37°C.

Les différentes réactions de PCR ont été réalisées avec les amorces suivantes :

Noms	Séquences des amorces
Oligo-dC	d(C)15
CH1 (μ 3)	5' - CAA gCA ggT gAg ACC CCT gTg - 3'
C κ 2	5' - CAC TCA TTC CTg TTg AAg CTC - 3'
C λ 2	5' - gAC ACA CTC TgC Agg AgA C - 3'
C λ 3-EcoRI	5' - gAg AgA ATT CAT gTg CCC Agg CTg TCC TT - 3'
C λ 8-Xho-I	5' - gAg ACT CgA ggA CAC ACT CTg CAg - 3'
μ 5-linker	5' - gAg ACT CgA ggg Agg Cgg Agg TTC Tgg Cgg Agg Cgg ATC Agg Cgg Agg TTC TCA ggT CCA GCT gCA gCA g - 3'

Les fragments obtenus respectivement pour les chaînes légère et lourde ont été sous-clonés en système TA Cloning (Invitrogen) pour être séquencées et permettre ainsi la détermination des régions CDR, la mise en évidence d'homologies avec d'autres espèces.

Ces résultats de séquence ont été utilisés afin de produire un sFv recombinant. Les régions variables des chaînes lourdes et légères ont été amplifiées séparément en utilisant différents types d'oligonucléotides : de liaison (μ 5) et CH1 pour la chaîne lourde ; λ 8 et λ 3 pour la chaîne légère. Ces produits de PCR ont été purifiés, puis digérés par l'enzyme de restriction *Xho*I, et enfin liés entre eux afin de fusionner les deux chaînes. Le produit de ligation obtenu a été alors amplifié à l'aide des oligonucléotides λ 3 et μ 3.

Le produit de PCR a été digéré avec les enzymes de restriction *Eco*RI et *Sma*I pour être sous-cloné en vecteur d'expression.

2.3.2. Séquençages

Différents fragments issus de PCR ou de produits de digestion ont été séquencés. Ce séquençage a lieu à partir d'amorces spécifiques du vecteur de sous-clonage (« Universal et Reverse primers ») ou à partir d'oligonucléotides spécifiques de l'insert clonés.

Les réactions de séquençage se réalisent suivant la méthode de Sanger, à l'aide du kit de séquençage (« Terminator reaction Cycle Sequencing Ready, ABI Prism », PE, Applied Biosystems), et sont déposées sur le séquenceur automatique ABI 377 (Perkin Elmer). Les séquences obtenues sont ensuite analysées à l'aide des programmes « Swiss-Prot and NBRF-PIRTM-protein databases » et « GenBank » (DNASTar, WI USA).

2.3.3. Traduction-transcription *in vitro*

Cette expérience a été réalisée dans le but de vérifier la possibilité pour nos constructions d'être effectivement traduites. Pour cela, le kit « TNTTM Coupled Reticulocyte Lyase System » a été utilisé. Brièvement, 1.5 μ g de plasmide recombinant a été incubé 1h30 à 37°C en présence de lysat de réticulocytes, d'acides aminés sans méthionine, de méthionine marquée au 35S, et de T7 polymérase. Un contrôle est réalisé en utilisant de l'ADN codant pour la luciférase. Le produit est analysé sur SDS-PAGE 13%. Après amplification du signal (Amplify, Amersham) et fixation, le gel est séché sous vide puis exposé sur film, une nuit à - 80°C.

2.4. Expression du sFv

2.4.1. Système bactérien

a) Production et purification de la protéine recombinante

Le fragment *EcoRI-SmaI* a été sous-cloné et exprimé en vecteur pGEX-4T3 (Pharmacia, Suède) dans la souche JM109 d'*E. coli*. Ce système permet une production de protéine recombinante fusionnée à une glutathion S-transférase (la Sj26GST), purifiée ensuite sur glutathion

Nous avons également exprimé notre construction en vecteur pQE30, dans la souche M15 d'*E. coli*. Dans ce système, la présence des 6 histidines en amont des sites de clonage permet une purification de la protéine recombinante sur colonne de chélate chargée en nickel (Qiagen).

L'expression de la protéine recombinante étant restreinte au niveau des corps d'inclusion dans ces systèmes, notre fragment sFv a donc subi des dialyses en séries contre du tampon Tris pH8.5 en présence de SDS à 0.02% et de concentrations décroissantes d'urée.

b) Etude de liaison à l'antigène

Ce test ELISA direct suit les conditions classiques décrites précédemment (§2.1.2). Brièvement, les puits sont adsorbés à des concentrations croissantes de protéines recombinantes. Après saturation, l'IPLSm1 biotinylé (anticorps Ab1) dilué au 1/500 est incubé pendant 1h30 à 37°C, puis révélé par la streptavidine-peroxydase.

c) Immunisations

Des rats Lou-M ont été immunisés par voie intra-péritonéale ou par la technique de Vaitukaitis (Vaitukaitis, 1971) avec 200µg d'un lot donné de protéine de fusion en présence de CFA. Une seconde injection identique (IFA) a été réalisée après 4 semaines. Les animaux témoins sont immunisés par de la GST et du CFA, ou du CFA seul.

D'autres essais d'immunisations ont été réalisés en aggrégeant la protéine au glutaraldéhyde, protocole préconisé pour l'immunisation par des anticorps anti-idiotypes.

d) Immunofluorescence

Ce marquage est réalisé sur des schistosomules non fixés. Les sérums d'immunisation, dilués au 1/100, sont incubés 2h à température ambiante. Rincés en PBS, les parasites sont alors incubés avec l'anti-IgG de rat marqué à la fluorescéine (Sigma), dilué au 1/40, pendant 30mn à 4°C.

e) Test de cytotoxicité

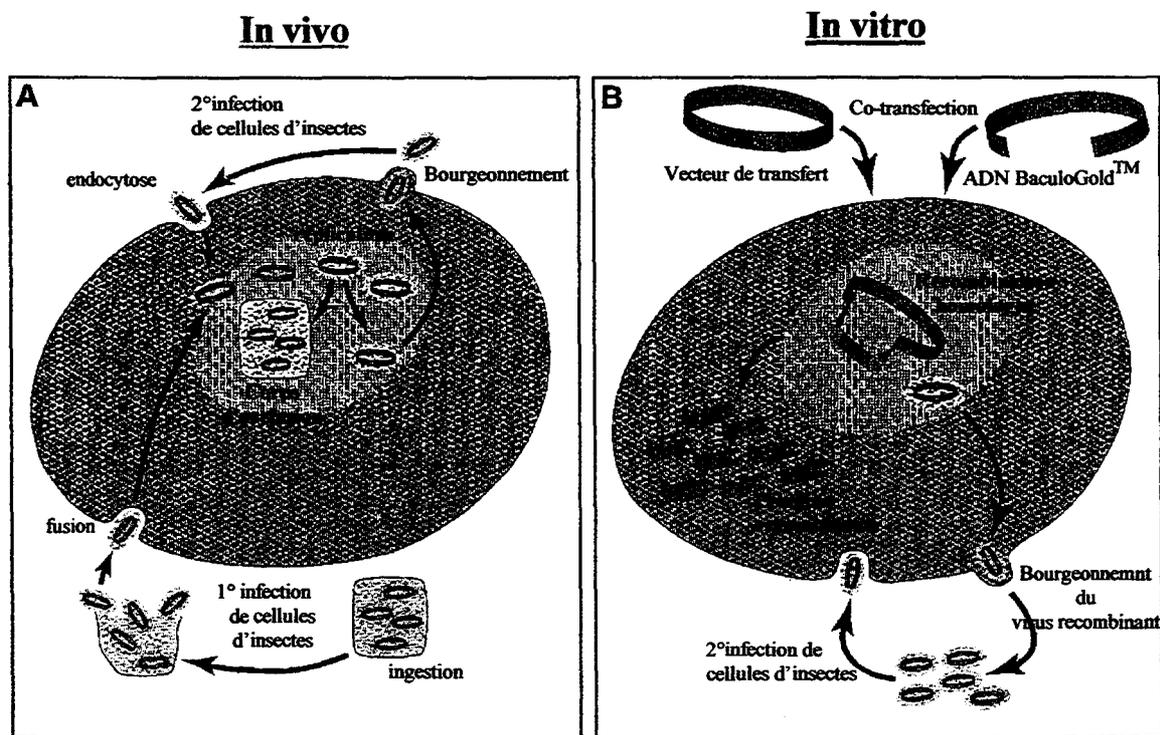
Des éosinophiles sont obtenus après lavage de la cavité péritonéale de rats préalablement stimulés par une injection I.P. d'eau physiologique. La cytotoxicité est évaluée vis-à-vis de schistosomules « peau »: préparés selon la technique de Clegg *et al.* (1972), ils correspondent au résultat du passage naturel de cercaires à travers un fragment de peau rasée prélevée sur l'abdomen d'une souris. Soixante dix schistosomules, contenus dans 50µl, sont alors ajoutés aux cellules; la mortalité des schistosomules est mesurée à 24h et 48h, par examen microscopique.

2.4.2. Système d'expression en cellules d'insectes/baculovirus

a) Phase de l'infection virale

Les baculovirus sont des virus à ADN double brin circulaire, spécifique de nombreuses cellules d'insectes. L'infection virale se déroule selon 3 phases (cf. schéma A). Tout d'abord les particules du virus *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis* (AcNPV) pénètrent dans la cellule par endocytose et migrent vers le noyau où l'ADN est libéré de la nucléocapside, pour ensuite suivre les processus de transcription et traduction de la cellule. La réplication débute dans les 6 premières heures d'infection. Six à 24 heures après l'infection, les cellules infectées libèrent dans le milieu extracellulaire des particules virales par "bourgeoisement" depuis la membrane cellulaire: en fusionnant, elles peuvent ainsi infecter de proche en proche des cellules saines. La dernière phase commence au delà de 24 h d'infection: elle correspond à la synthèse d'une matrice homogène, constituée essentiellement d'une seule protéine, la polyhédrine, dans laquelle sont assemblées des particules

virales. Nommées alors corps d'occlusion, ils sont visibles en microscopie optique et ne seront libérés que suite à la lyse de la cellule infectée.



La polyédrine n'étant pas une protéine nécessaire à la réplication du baculovirus *in vitro*, le promoteur fort du gène a donc été exploité pour l'expression de gènes hétérologues. De plus, l'ADN de l'AcNPV linéarisé contient une délétion létale (BaculoGold™, Pharmingen, France) qui sera restaurée par recombinaison homologue lors de la cotransfection avec le vecteur complémentaire contenant le gène d'intérêt. Ainsi seuls les recombinants produiront des virus viables, avec pour conséquence un taux de recombinaison de plus de 99%.

L'expression du sFv s'est faite indifféremment en cellules Sf9, cellules adhérentes, cultivées à 27°C sans apport de CO₂, en milieu de Grace (GibcoBRL, France) complété avec 10% de sérum de veau foetal (Boehringer), ou en cellules High Five, adaptée ici en milieu X-press (Bio Whittaker, Belgique).

b) Cotransfection et amplification virale

L'expression de gènes d'immunoglobulines utilisant des vecteurs baculovirus nécessite l'insertion de ces gènes dans le génome viral. Cette étape est fondée sur la recombinaison homologue entre un plasmide bactérien (appelé vecteur de transport ou vecteur navette) et l'ADN génomique du baculovirus (cf. schéma B). Le vecteur navette choisi est le pAcSecG2T: il s'agit d'un vecteur d'expression de protéine fusionnée avec la Glutathion-S-Transférase. Notre construction est insérée en aval de la région codant pour la GST au niveau du site SmaI. Le gène de la GST est précédé de la séquence signal gp67 (glycoprotéine de surface la plus abondante de l'enveloppe virale), clivée au cours du transport de la protéine recombinante au travers de la membrane, elle permettra la sécrétion de la protéine de fusion.

Les cellules Sf9 sont co-transfectées selon le protocole du manuel d'utilisation, à une densité de $2 \cdot 10^6$ cellules avec 3,5 µg de vecteur recombinant et 0,5 µg d'ADN viral linéarisé. Après 5 jours d'incubation à 27°C, le surnageant infectieux est récupéré pour infecter de nouvelles cellules. L'enrichissement en particules virales est réalisé par infection successive de cellules Sf9. Un stock de particules virales de titre élevé est nécessaire pour infecter les cellules dans des conditions standards et optimales de MOI ("Multiplicity Of Infection" qui est le nombre de virus/ml par rapport au nombre de cellules). L'obtention d'une infection synchrone pour l'ensemble des cellules nécessite une MOI supérieure à 1; mais pour ne pas réduire le métabolisme des cellules d'insecte par l'activité lytique du virus, la MOI doit cependant rester inférieure à 10.

c) Titration du stock de baculovirus recombinant

La titration virale est réalisée par dilution "point-limite". Cette méthode statistique consiste en l'inoculation de plusieurs cultures cellulaires avec différentes dilutions virales. Le titre est estimé par détermination de la dilution qui permet d'infecter 50% des cultures (TCID₅₀). Ce titre, en pfu (plaque forming unit)/ml, correspond à au TCID₅₀/ml affecté d'un facteur spécifique du couple virus/cellule hôte (0,69 pour le couple baculovirus/SF9). 10µl de suspension cellulaire à 2,5.10⁵ cellules/ml sont déposés dans chaque puits d'une microplaque de Terazaki (Nunc). Le stock viral est dilué de 10⁻³ à 10⁻⁷; chaque dilution permet d'infecter 6 puits. Après 6 jours de culture, le nombre de puits infectés est comptabilisé pour procéder au calcul de la titration.

$$\text{Titre (pfu/ml)} = 1/\text{TCID}_{50} \times 0,69 \times \text{volume (ml) de l'infection}$$

avec $\text{Log TCID}_{50} = \text{Log "dilution donnant plus de 50\% de puits infectés"} - \text{PD}$

PD = distance proportionnée par rapport à la concentration donnant 50% de puits infectés = (A-50)/(A-B)

A : pourcentage supérieur à 50% de puits infectés

B : pourcentage inférieur à 50% de puits infectés

Concentration virale	Pourcentage de puits infectés
10 ⁻³	100
10 ⁻⁴	100
10 ⁻⁵	100
10 ⁻⁶	50
10 ⁻⁷	33

Titre du stock viral : 6,9.10⁷ pfu/ml.

d) Production et purification du sFv

Les cellules SF9, en milieu X-Press, sont infectées à partir du stock de baculovirus recombinant. La protéine de fusion est purifiée sur billes de Glutathion-Agarose (Sigma).

Après 3 jours d'infection, cellules et surnageant sont récupérés. Les cellules sont lysées sur glace 2h, en tampon de lyse. Surnageant de culture et lysat cellulaire sont centrifugés à 12000g pendant 30'. Les surnageants de centrifugation sont chargés sur colonne de glutathion-agarose, préalablement équilibrée en tampon d'équilibration. La colonne est lavée par le même tampon jusqu'à obtention en sortie de colonne d'une DO nulle à 280 nm. La protéine de fusion est éluée par le tampon d'éluion, en suivant la DO à 280 nm. L'éluat est récupérée avec 1/10 de volume de tampon d'équilibration pour assurer la neutralisation.

L'éluat est dialysé contre une solution Tris 2mM pH 7,5, puis concentré par traitement à l'aquacide.

e) Détection de la protéine recombinante

-Western blot

La protéine produite est analysée sur SDS-PAGE 13%, et transférée sur nitrocellulose pendant 3h à 60V (Twobin et al., 1979). Les sites de fixation non spécifiques sont saturés en PBS-5% de lait pendant 2h à température ambiante, puis les filtres sont incubés une nuit à 4°C avec le sérum dilué au 1/100 (polyclonal de lapin) en PBS-lait 5%. Après 3 lavages en PBS-Tween-20 0.4%, les filtres sont incubés en présence d'un conjugué anti-IgG de lapin (Sanofi-Pasteur, France) marqué à la peroxydase (dilué au 1/500) pendant 2h à température ambiante. Après 3 lavages, la révélation s'effectue avec le substrat de la « Horse Radish Peroxydase » (4-chloro-1-naphtol, BIO-RAD) en présence d'eau oxygénée. La réaction est arrêtée avec de l'eau distillée.

-ELISAs

Brièvement, les plaques sont adsorbées une nuit à 4°C avec 10µg d'IPLSm1, puis saturées 1h à température ambiante en PBS-Gélatine 0.5%. La protéine produite au niveau du surnageant ou des lysats cellulaires dans le système d'expression cellules d'insectes/baculovirus, est incubée à différentes dilutions, puis révélée à l'aide d'IgG précipitées à partir d'un anticorps polyclonal de lapin anti-sFv.

f) Immunisations

Des rats LouM ont été immunisés en Vaitukaitis avec 200µg des sFv produits en système baculovirus/cellules d'insectes, rappelés ensuite par voie sous-cutanée après 3 semaines.

g) Clivage à la thrombine

Il est réalisé à raison d'un microlitre d'enzyme (Sigma), soit 250U/mg de protéine à digérer en tampon NaCl (150 mM final) et CaCl₂ (2.5mM final) pendant 2 h à 20°C.

DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES

Le développement des méthodes d'analyse des glycoconjugués a permis de dévoiler progressivement l'extraordinaire diversité des glycanes et de révéler leur remarquable potentiel d'informations. Rappelons que trois acides aminés dans un tripeptide ne permettent que six combinaisons, alors que trois sucres peuvent aboutir à 27 648 combinaisons différentes! Ils génèrent donc une grande partie de la diversité fonctionnelle nécessaire au développement et à la différenciation d'organismes complexes, mais interviennent également dans les interactions avec d'autres organismes de l'environnement.

Les glycoconjugués ont une distribution ubiquitaire. On les retrouve aussi bien en situation extra-cellulaire qu'en situation intra-cellulaire: tous les compartiments cellulaires contiennent des glycoconjugués.

Les réactions de glycosylation modifient les propriétés physico-chimiques d'une protéine ou d'un lipide, mais elles représentent surtout un langage qui est progressivement décrypté (Kasai et Hirabayashi (1996) parlent de "glycocode"), et qui intervient dans de multiples fonctions. A l'intérieur de la cellule, elles peuvent moduler la fonction de protéines cytoplasmiques ou nucléaires, contrôler la conformation et le trafic des glycoprotéines sécrétées ou encore permettre l'adressage de glycoprotéines vers certains compartiments tels que les lysosomes. A la surface de la cellule, les glycoconjugués constituent des signaux de reconnaissance permettant des interactions cellules-cellules, ou des interactions entre les cellules d'un organisme animal ou végétal et les microorganismes de l'environnement. Enfin, les glycosylations conditionnent la destinée, la durée de vie, la structure et la fonction enzymatique, hormonale ou de transport des glycoprotéines.

Ainsi, il est difficile de prévoir les fonctions et l'importance d'un oligosaccharide donné sur un glycoconjugué, bien que souvent une séquence inhabituelle peut remplir un rôle crucial. Une même séquence oligosaccharidique peut médier différentes fonctions à l'intérieur du même organisme, à des temps différents de son ontogénie. Ils sont de plus les sujets de variations intra et inter-espèces au cours de l'évolution.

Dans la relation hôte-parasite, les glycoconjugués parasitaires sont indiscutablement les cibles majeures de la réponse immunitaire de l'hôte lors d'une infection par *S. mansoni*, alors que les difficultés liées à leur approche biochimique ont conduit à sous-estimer leur rôle fonctionnel. Récemment, Vellupillai *et al.* (1994) ont mis en évidence pour la première fois le rôle d'une séquence oligosaccharidique dans l'orientation de la réponse cellulaire, et plus particulièrement le rôle du Lacto-*N*-fucopentaose qui contient le trisaccharide Le^x. Cet antigène Le^x, présent en grande quantité sur les oeufs du schistosome (Nyame *et al.*, 1998), joue également un rôle dans l'établissement d'une immunité protectrice par le biais d'anticorps qui lui sont spécifiques. Le motif glycanique lui-même est utilisé par l'hôte pour favoriser des phénomènes de cytotoxicité (Trottein *et al.*, 1997).

Au vu du rôle fonctionnel de ces carbohydrates, nous avons étudié chez le rat l'influence de glycanes spécifiques de *S. mansoni* dans trois approches différentes, qui définiront les différentes parties de la discussion de nos résultats: les antigènes associés à l'oeuf; les glycanes portés par la KLH, approchés par une purification incomplète ou par déglycosylation; et enfin l'épitope carbohydrate caractérisé sur la gp38 de *S. mansoni*, par le biais d'une approche anti-idiotypique.

I. Les oeufs de schistosome :

inducteurs d'une réponse IgA chez le rat

Lors de l'invasion de son hôte vertébré, le parasite *S. mansoni* touchera successivement trois sites muqueux: la peau, à travers laquelle pénètre la forme infestante; les poumons, qui abritent le schistosomule; et enfin la muqueuse intestinale, siège de la pathologie bilharzienne. Ainsi de manière d'autant plus significative dans l'infection par *S. mansoni*, la réponse d'isotype

IgA, particulièrement adaptée à la protection des surfaces muqueuses, apparaît essentielle dans la défense vis-à-vis de ce pathogène.

Dans l'infection par *S. mansoni*, des anticorps IgA sériques se sont révélés larvicides chez le rat (Grezel *et al.*, 1993) et, dans des études menées chez des patients kenyans infectés par *S. mansoni* (Grzych *et al.*, 1993), ils ont été corrélés avec l'acquisition d'une résistance à la réinfection.

Les expériences présentées dans la première partie de ce travail thèse ont démontré que **les antigènes associés à l'oeuf de schistosome sont capables d'induire une réponse IgA muqueuse chez le rat**. Ce résultat est d'autant plus d'intéressant de par la physiologie particulière de ce modèle animal: il est semi-permissif pour l'infection par *S. mansoni* et il est pourvu d'un système hépatobiliaire de transport actif des IgA, encore récemment mis en évidence chez un autre rongeur, le hamster syrien doré (*Mesocricetus auratus*) (Vaerman *et al.*, 1997). D'autre part, lors d'une infection par *S. mansoni*, le rat ne développe aucune réponse IgA spécifique qu'elle soit muqueuse ou sérique, alors que dans d'autres infections, notamment par le parasite nématode *Nippostrongylus brasiliensis* (Ramaswamy *et al.*, 1989), une augmentation de la synthèse locale de cet isotype peut être observée au niveau pulmonaire. Des mécanismes de régulation propres à l'infection par *S. mansoni* peuvent donc apparaître au sein du même modèle animal. L'efficacité de la "pompe à IgA" semblerait donc relative au modèle d'infection étudié.

Dans l'optique d'appréhender les mécanismes d'induction d'une réponse IgA chez le rat, différents antigènes ont été testés: l'administration de SEA *per os* ou par voies classiques d'immunisation (parentérale et systémique), l'injection de schistosomules maturés ou non par voie intra-veineuse... Seule l'injection d'oeufs vivants par voie intra-veineuse s'est avérée systématiquement efficace quant à l'induction d'une réponse IgA locale spécifiques du SEA, dès 8 jours après l'injection. Soulignons que les antigènes liés à l'oeuf comprennent des structures très riches en glycanes, donc très antigéniques (Norden *et al.*, 1984; Omer Ali *et al.*, 1986).

Poulain-Godefroid *et al.* (1996) ont démontré dans le modèle murin, que des réponses IgA et IgG étaient fortement augmentées après l'oviposition, alors qu'en absence d'oeufs (chez des animaux soumis à une infection monosexuée), les réponses IgA sériques et intestinales spécifiques apparaissaient très réduites.

Ces données se sont donc confirmées chez le rat, à savoir que **les oeufs de *S. mansoni* ont un rôle stimulateur de la production d'IgA de spécificité parasitaire.**

Dans nos conditions expérimentales d'injection d'oeufs par voie intra-veineuse, seule une réponse IgG2c pulmonaire est détectée plus tardivement après l'injection d'oeufs. Ces résultats tendent à considérer l'évolution de la réponse humorale muqueuse vers un profil mixte Th1/Th2. Par ailleurs, les réponses IgA et IgG2c tardives induites s'avèrent également spécifiques de la KLH, qui est aussi capable de stimuler une réponse cellulaire spécifique dans ce cas. Cependant, malgré les propriétés de l'épitope glycanique commun à la gp38 et à la KLH décrites précédemment, aucune relation directe n'a été établie entre les isotypes (IgG2c et IgA) induits localement dans nos conditions expérimentales et cet épitope particulier présent parmi les antigènes associés à l'oeuf.

Cette réponse IgA muqueuse n'a pu être associée à aucun effet fonctionnel *in vitro*, ni même en terme de protection vis-à-vis du parasite. Soulignons à ce titre que les activités larvicides précédemment évoquées dans les travaux de Grezel *et al.* (1993) chez le rat, concernaient des IgA sériques, caractérisées dans un modèle d'immunisation par une protéine, la Sm28GST. D'autre part, elles limitent les phénomènes inflammatoires par leur faible capacité à activer le complément, ce qui permet de préserver l'intégrité des muqueuses.

Nous disposions d'un modèle d'intérêt nous permettant de caractériser les cytokines associées à l'induction d'une réponse IgA locale, données peu connues chez le rat. Nous avons détecté la présence des ARNm de certaines cytokines *in vivo* grâce à la technique de RT-PCR semi-quantitative, plus particulièrement au niveau de la rate, du poumon, et des ganglions

périoraortiques, dans le but de suivre l'apparition de la réponse IgA consécutive à une stimulation cellulaire locale. L'étude de la production de ces mêmes cytokines suite à des expériences de restimulation *in vitro* a été limitée par la disponibilité des outils immunologiques spécifiques d'interleukines chez le rat.

Aucune expression d'ARNm d'IL-4 ou d'IFN- γ n'a été détectée. En ce sens, l'utilisation de souris Knock-Out pour l'IL-4 indique un nombre identique de cellules sécrétrices d'IgA dans les muqueuses démontrant que la commutation isotypique vers l'IgA est normale chez ces animaux. Or dans certains modèles étudiés *in vitro*, l'IL-4 apparaît comme un facteur essentiel de commutation vers une production d'IgA (Lin *et al.*, 1991; Wakatsuki *et al.*, 1993; Ehrhardt *et al.*, 1992). De même, Vajdy *et al.* (1995) démontrent que la déficience en IL-4 entraîne entre autre une incapacité des animaux à produire une réponse IgA muqueuse spécifique d'un antigène administré par voie orale.

Au niveau de la rate, l'augmentation précoce de TGF- β suggère l'association de cette cytokine avec l'expression de la réponse IgA, précédemment décrite en tant que facteur de commutation chez l'homme (Islam *et al.*, 1991; Van Vlasselaer *et al.*, 1992). En fait, la dysrégulation du TGF- β peut contribuer à la pathogénèse de patients déficients en IgA (Miuller *et al.*, 1995). Cette cytokine possède *in vitro* un effet immunosuppresseur sur la sécrétion d'immunoglobulines sauf pour l'isotype IgA (Barnard *et al.*, 1990; Massague *et al.*, 1990). Contrairement à ces observations, dans notre modèle nous sommes capables de caractériser des réponses IgM voire IgG1 et IgG2c sur une cinétique prolongée; ceci dépendrait de l'état d'activation des cellules sécrétrices. En effet, les récents travaux de Goodrich *et al.* (1998) ont démontré *in vitro* sur des cultures de cellules épithéliales intestinales, que l'IL-6 était capable d'augmenter la production d'IgA alors que le TGF- β avait un effet immunosuppresseur sélectif viv à vis de la sécrétion d'IgM; or dans le même système, mais cette fois avec des cellules préalablement stimulées par du LPS, l'IL-6 pouvait outre-passer l'effet du TGF- β en augmentant la réponse humorale.

De plus, le TGF- β peut induire la production d'IL-6 (Chantry *et al.*, 1989), ce qui pourrait expliquer la production décalée de l'ARNm codant pour l'IL-6 observée au niveau de la rate des animaux injectés. Par restimulation *in vitro*, l'IL-6 apparaît inductible tout au long de la cinétique avec cependant un maximum à j21; cette production serait consécutive à l'expression splénique de l'ARNm correspondant. L'IL-6 est une interleukine pluripotente, capable entre autre d'induire la différenciation terminale des cellules B (Okada *et al.*, 1983; Van Snick *et al.*, 1986) et d'augmenter sélectivement la production d'IgA *in vitro* par commutation isotypique des cellules B (Beagley *et al.*, 1989; Fujihashi *et al.*, 1991). D'autre part, l'utilisation de souris Knock-Out pour l'IL-6 démontre le rôle essentiel de cette cytokine *in vivo* dans le développement d'une réponse IgA pulmonaire (Ramsay *et al.*, 1994). De même, Bao *et al.* (1998) ont récemment démontré que l'administration intraluminale d'IL-6 exogène augmentait la différenciation des cellules B en plasmocytes à IgA, et ils suggèraient une potentielle utilisation de cette cytokine à des fins thérapeuthiques dans un contexte de vaccination muqueuse.

Dans nos expériences, une expression précoce d'IL-10 pourrait expliquer l'expression tardive d'IL-6 au niveau de la rate des rats injectés. L'IL-10 est une cytokine impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle de cette dernière pour des macrophages activés (Fiorentino *et al.*, 1991). Cette expression précoce d'IL-10 corrèle avec les résultats obtenus en restimulation spécifique de splénocytes des rats injectés, où cette cytokine, bien qu'inductible sur toute la cinétique considérée, est maximum à j3. L'IL-10 est également impliquée dans la sécrétion d'IgA par des cellules B humaines et murines (Ishida *et al.*, 1993; Brière *et al.*, 1994). Elle peut aussi lever une inhibition dans la différenciation des cellules B ou inversement permettre la différenciation de cellules B de patients déficients en IgA (Brière *et al.*, 1996).

L'analyse de l'ARNm codant pour l'IL-5 révèle une augmentation significative et précoce de sa production au niveau de la rate, alors que dans notre système de restimulation *in vitro* de splénocyte des rats injectés, une production maximale d'IL-5 est détectée à 16 jours après l'injection. Différents travaux réalisés dans d'autres modèles rapportent une activité de

l'IL-5 au niveau des plasmocytes à IgA, seule (Beagley *et al.*, 1988), ou en synergie avec l'IL-4 (Murray *et al.*, 1987) ou le TGF- β (Coffman *et al.*, 1989). De même, l'utilisation d'un vecteur exprimant sélectivement l'IL-5 suite à une immunisation locale, augmente le taux d'IgA spécifiques au niveau pulmonaire chez la souris (Ramsay *et al.*, 1993). Ces éléments confortent donc le rôle de cette cytokine dans notre modèle.

L'ensemble de ces données confirment chez le rat, les résultats obtenus lors des expérimentations mono/bisexuées réalisées chez la souris (Poulain-Godefroid *et al.*, 1996): en plus du rôle stimulateur de la production d'IgA spécifiques du parasite, les oeufs auraient également un rôle polarisateur en terme d'émergence d'un profil de type Th2 chez le rat (à la présence près de l'IL-4). Cette notion de sous-populations cellulaires de type Th1 ou Th2, identifiés phénotypiquement et fonctionnellement chez le rat (Arthur *et al.*, 1986; Papp *et al.*, 1992) semble correspondre aux sous-populations murines ou humaines.

L'établissement d'une réponse IgA pulmonaire chez le rat se traduit par l'expression préalable d'ARNm codant pour différentes cytokines, paradoxalement plutôt majoritaires au niveau splénique. La production d'IL-5 et d'IL-10 est précoce mais transitoire alors qu'elle apparaît durable pour le TGF- β voire même décalée dans le temps pour l'IL-6. Un délai semble donc nécessaire pour pouvoir détecter une expression d'ARNm codant pour ces cytokines au niveau des ganglions périaortiques et des poumons (surtout pour le TGF- β et l'IL-6).

Dans nos conditions, la production initiale de cytokines apparaît d'abord au niveau systémique, puis au niveau muqueux. Ces différences dans l'apparition cinétique notamment du TGF- β et de l'IL-6 entre les poumons et la rate, peuvent être expliquées par la présentation antigénique, qui, dans ce modèle d'étude, est fonction du système systémique et non de l'environnement externe en contact avec les muqueuses. La description de tels phénomènes laisse supposer des mécanismes complexes de régulation entre ces interleukines, mais aussi entre les différents organes. Classiquement, la sensibilisation vis-à-vis de l'antigène a lieu au niveau des organes périphériques; puis, après la recirculation des cellules lymphoïdes, celles-ci séjourneront

finalement dans la rate au niveau de la pulpe blanche. Des études immunohistochimiques menées chez des individus infectés par *S. mansoni*, réalisées avec des anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes carbohydrates répétitifs d'oeufs, ont montré la présence en grande quantité de matériel antigénique au niveau de la rate. Ces résultats suggèrent un rôle important de cet organe dans la clairance et l'apprêtement des antigènes (Bogers *et al.*, 1996).

Le rôle inflammatoire de l'IL-6 dans la formation pseudogranulomateuse observée au niveau pulmonaire est à remarquer dans ce modèle: cette cytokine aux propriétés chimioattractantes, pourrait expliquer le recrutement cellulaire au niveau des LBA. Dans ce contexte de réponse inflammatoire, l'IL-13 semble représenter une cytokine essentielle dans la régulation de la formation de granulomes pulmonaires chez des souris injectées par des oeufs (Chiaramonte *et al.*, 1999). Soulignons que notre modèle artificiel permet une stimulation constante du tissu lymphoïde muqueux associé aux bronches (ou BALT), étant donné que les oeufs se trouvent piégés au niveau pulmonaire, semblable au contact permanent offert au niveau du tissu lymphoïde muqueux associé à l'intestin (ou GALT) dans un système d'infection classique chez la souris.

Chez le rat, peu de travaux concernent la réponse IgA. Rafferty *et al.* (1995) ont démontré *in vitro* un effet stimulateur du TGF- β , de l'IL-2, IL-5 et IL-6 sur la production d'IgA dans des cultures cellulaires de parotide, et de glandes submandibulaires et sublinguales de rat. Ces études supportent un rôle régulateur potentiel de ces cytokines sur la réponse IgA au niveau des glandes salivaires du rat. D'autres études ont montré que l'IL-5 et l'IL-6 étaient capables d'augmenter la réponse *in vivo* au niveau des larmes de rat (Pockley *et al.*, 1991).

Indépendamment de ce contexte cellulaire, d'autres facteurs peuvent intervenir dans la régulation d'une réponse IgA. Très récemment, une étude conduite chez des patients infectés par *S. mansoni* puis traités (Remoué *et al.*, 1998) suggérait que l'acquisition de la réponse

immunitaire était dépendante du sexe, à savoir que des taux d'IgA neutralisants étaient détectés préférentiellement chez la femme. L'association entre une réponse IgA et l'acquisition d'une résistance à la réinfection, elle-même sous-dépendance de l'âge des patients infectés (Grzych *et al.*, 1993), soutient l'idée d'une influence hormonale dans la régulation de la réponse IgA. Des travaux récents réalisés chez le rat sont en faveur d'un effet de la DHEA (déhydroépiandrostérone) sur la réponse IgA sérique (Vargas *et al.*, 1998). Une influence de l'innervation sympathique et parasympathique a pu être également démontrée sur la sécrétion d'IgA salivaires chez le rat (Carpentier *et al.*, 1998).

II. Caractéristiques biochimiques et immuno-modulatrices de l'épitope commun à la KLH (*Megathura crenulata*) et à la gp38 (*Schistosoma mansoni*)

La KLH est une glycoprotéine renfermant environ 5% d'oses totaux. Elle est très largement utilisée en tant que molécule "porteuse", à des fins vaccinales (Khan *et al.*, 1992), immunothérapeutiques (Flamm *et al.*, 1990; Jurincic *et al.*, 1988; Käble *et al.*, 1991; Winkler *et al.*, 1996), ou encore prophylactique (Bagasra *et al.*, 1992). Cette hémocyanine porte un épitope glycanique commun avec la gp38 caractérisée à la surface du schistosomule grâce à l'anticorps monoclonal IPLSm1 d'isotype IgG2a cytotoxique *in vitro* en présence d'éosinophiles, et qui confère par transfert passif un haut degré de protection vis-à-vis d'une infection cercarienne (Dissous *et al.*, 1982; Grzych *et al.*, 1982). Outre l'expression de cet épitope commun au niveau du miracidium ou du ver adulte dans les produits métaboliques du parasite, il a aussi été identifié chez l'hôte intermédiaire de *S. mansoni*, le mollusque marin *Biomphalaria glabrata*. Il y a donc une identité moléculaire entre le trématode et son hôte. Ceci pose le problème de la signification biologique de ce motif glycanique conservé au cours de l'évolution, et dont les origines remontent à plusieurs centaines de millions d'années.

L'étude de structures oligosaccharidiques de microorganismes (Miller *et al.*, 1986) peuvent nous amène à penser que la conservation de cet épitope glycanique se justifierait par son rôle dans l'adaptation rapide du schistosome aux brusques modifications d'osmolarité de son environnement subies lors du passage du stade larvaire libre dans l'eau, à un état captif des tissus de l'hôte définitif.

Déglycosylée par l'action de l'acide trifluoro-méthane-sulfonique (TFMS), la KLH perd toute activité inhibitrice dans la liaison de l'anticorps IPLSm1 à la gp38 (Grzych *et al.*, 1987). Des études biochimiques ont permis d'apporter des éléments préliminaires concernant la nature des oligosaccharides et la structure de l'épitope glycanique reconnu par l'anticorps IPLSm1. Soulignons l'avantage que représente l'utilisation de cette molécule quant à la quantité de matériel disponible pour les diverses analyses biochimiques, comparativement à la lourde préparation que représente l'isolation de l'antigène parasitaire glycanique. Elle est d'ailleurs largement utilisée en tant que réactif diagnostique dans la séroépidémiologie des Bilharzioses humaines.

Dans un premier temps, les glycanes totaux de la KLH ont été isolés et analysés, puis la purification par chromatographie d'immuno-affinité du glycanes reconnu par l'anticorps IPLSm1 a été entreprise. L'analyse de la composition moléculaire des glycanes totaux de la KLH par chromatographie en phase gazeuse a révélé l'existence des 6 monosaccharides suivants: du fucose (pourtant absent du stade schistosomule), du galactose, du xylose, du mannose, de la N-acétyl-glucosamine et de la N-acétyl-galactosamine. La présence en quantité importante de résidus galactose et de N-acétyl-galactosamine suggère en outre la présence de liaisons N-glycosidiques. La purification de l'épitope glycanique par chromatographie d'immuno-affinité sur colonne d'IPLSm1 a conduit à la séparation de 4 fractions. Seule la dernière fraction éluée reproduisait l'effet global de la KLH native dans ses capacités inhibitrices de la liaison entre l'IPLSm1 et l'antigène cible. L'analyse des rapports molaires de cette fraction par chromatographie en phase gazeuse diffère peu de la fraction totale de la KLH et incite à penser que le glycanes recherché serait de type bi-antenné avec un résidu de fucose et de xylose

conjugués au résidu de mannose β . Cette structure serait comparable à la structure du glycane de l'hémocyanine de *Helix pomatia* (Van Kuik *et al.*, 1985) à la présence près du chaînon galactose(β -4)N-acétyl-glucosamine. Des études complémentaires d'analyse en RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et des expériences de méthylation permettraient de préciser ces hypothèses.

La caractérisation biochimique de l'épitope glycanique commun à la KLH et à la gp38 de *S. mansoni* nous intéressait dans l'optique d'y associer une fonction immunologique en terme de réponse humorale et cellulaire. Elucider la structure de cet épitope permettrait d'aborder sa dualité fonctionnelle à induire des anticorps d'isotypes différents voire même antagonistes. Cette perspective apporte un support moléculaire à la notion d'immunité concomitante de par la production d'anticorps effecteurs et d'anticorps bloquants. Ces derniers permettent au parasite d'échapper à la réponse immunitaire qu'il suscite. D'autre part, disposer de cet épitope par purification ou par synthèse chimique ouvre des perspectives d'étude d'ordre moléculaire quant aux mécanismes intra-cellulaires impliqués. On peut en effet imaginer une reconnaissance de récepteurs particuliers (ITIM / ITAM), spécifiques d'une cascade intra-cellulaire conduisant à l'expression d'anticorps effecteurs ou au contraire d'anticorps bloquants. Des études classiques de conjugaison de cet haptène carbohydrate sur différentes molécules porteuses, permettrait d'autre part d'évaluer l'activité immunostimulatrice de l'épitope conjugué, et sa capacité à induire une réponse mémoire. Enfin, l'étude des glycosyltransférases impliquées dans la synthèse de cet épitope apporterait une autre dimension en permettant de caractériser les mécanismes de régulation liés à l'expression de cet épitope. Ces enzymes spécifiques du parasite, pourraient être utilisées à des fins thérapeutiques.

Les expériences d'inhibition de fixation de l'IPLSm1 sur la KLH ont exclu toute communauté avec les sucres connus tels que le Le^a, Le^x, pseudo- Le^x, ou encore le LNFP I, II, III, alors que le Lex ou le LNFP III ont un rôle largement caractérisé dans l'infection par *S. mansoni* (Trottein *et al.*, 1997; Vellupilai *et al.*, 1994). Elles ont de plus confirmé une réactivité croisée entre le stade schistosomule et les oeufs de schistosome.

Dans le but de palier à cette purification incomplète de l'épitope d'intérêt, nous avons envisagé une approche immunologique globale des glycanes portés par la KLH par "défaut", en déglycosylant la molécule dans des expériences d'immunisations comparées. De manière intéressante, la molécule de KLH semble, dans nos conditions expérimentales, perdre toute immunogénicité en terme de réponse humorale spécifique de *S. mansoni*, mais pas en terme de réponse cellulaire. Cette molécule, mis à part son haut poids moléculaire, doit toute son immunogénicité à la présence de glycanes qui permettent d'orienter une réponse immunitaire spécifique, indépendamment de sa structure protéique.

Ces résultats sont en accord avec les travaux précédemment réalisés par Grzych *et al.* (1987), où la déglycosylation de la KLH abolissait toute réponse humorale spécifique ainsi que l'effet inhibiteur dans la fixation de l'IPLSm1 à son antigène cible. De même, la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles des sérums de rat immunisés par de la KLH déglycosylée était considérablement réduite, ce qui confirmait une identité structurale et fonctionnelle *in vitro* comme *in vivo* entre les épitopes portés par la KLH et la gp38.

L'immunisation par la KLH native conduit à une réponse essentiellement d'isotypes IgG2a, spécifiques également du SEA. Ce profil isotypique, plutôt de type Th2 chez le rat, est associé à une production d'IL-4 significative *in vivo* 4 jours après l'injection, et même *in vitro* après restimulation par la molécule native. Notons cependant un effet stimulateur de la KLH déglycosylée uniquement chez les rats immunisés par la molécule native au regard de la production d'IL-4 ou d'IL-5: la structure protéique de cette molécule semble donc conserver un potentiel immunogénique en terme de réponse cellulaire bien qu'il ne soit pas associé à une réponse humorale spécifique de *S. mansoni*. Chez la souris, l'immunisation par de la KLH entraîne de même la sécrétion de cytokines Th2, telles que l'IL-4, l'IL-5, mais surtout d'IL-10 en quantité importante (cependant, dans notre étude, cette cytokine n'a pas été détectée *in vivo* par RT-PCR semi-quantitative et n'a pas été testée *in vitro*).

Les travaux de Crépieux (1987) ont rapporté que des injections répétées à 2 semaines d'intervalle de KLH chez le rat (de 3 à 5 doses de 100µg) pouvaient induire la production d'anticorps d'isotypes IgG2c, bloquants en terme de cytotoxicité dépendante d'éosinophiles. L'ensemble de ces données d'ordre immunologique confirme la dualité fonctionnelle des glycanes portés par la KLH, et l'antigène de 38 kDa de *S. mansoni*. La spécificité commune des 2 types d'anticorps sous-tend aussi l'hypothèse d'une compétition au niveau de la cible parasitaire, comme au niveau des récepteurs pour le fragment Fc des IgG à la surface des éosinophiles (Grzych *et al.*, 1984).

Enfin de récents travaux confortent la possibilité d'utiliser un épitope de nature carbohydrate à des fins vaccinales. Une "hyper-immunisation" de polysaccharides capsulaires de *Neisseria meningitidis* renforce considérablement la réponse humorale spécifique, allant jusqu'à générer des cellules B mémoires (Colino *et al.*, 1998). De même, Guttormsen *et al.* (1998) ont démontré *in vivo* que le couplage covalent d'un haptène polysaccharidique sur une protéine porteuse peut conférer une mémoire immunitaire vis-à-vis de la partie sucrée.

III. Construction d'un fragment anticorps anti-idiotype recombinant mimant l'épitope carbohydrate parasitaire protecteur

Dans le contexte d'étude des propriétés fonctionnelles des glycanes de *S. mansoni*, et plus particulièrement de l'épitope glycanique protecteur de la gp38, nous avons développé une approche anti-idiotypique, originale car elle représentait le premier exemple de ce genre en parasitologie.

Nous disposons d'un anticorps anti-idiotype Ab2 mimant l'épitope carbohydrate, anticorps qui était capable par immunisation d'induire un haut degré de protection vis-à-vis d'une infection

chez le rat. De même, les anticorps polyclonaux Ab3 induits par immunisations des Ab2 se sont avérés spécifiques de l'antigène de 38 kDa. Cytotoxiques en présence d'éosinophiles, ils conféraient par transfert passif une immunité vis-à-vis d'une infection par *S. mansoni* (Grzych *et al.*, 1985).

Une partie de notre travail de thèse a consisté à cloner les régions variables de cet anticorps et à construire ainsi un fragment recombinant simple chaîne (sFv), à l'image de l'épitope carbohydrate protecteur. Ce concept permet une nouvelle approche des antigènes carbohydrates limités dans leur exploitation, et il peut, de plus, pallier aux problèmes liés à l'instabilité de certains hybridomes ou lymphocytes humains transformés.

Différents exemples illustrent l'efficacité d'utilisations de tels sFv. Par immunisation, ces peptides recombinants peuvent induire une protection contre une infection à dose létale de *Neisseria meningitidis* du groupe C (Westerinck *et al.*, 1995); neutraliser l'activité de différentes souches de virus d'immunodéficience humaine (Agadjanyan *et al.*, 1997); également induire une réponse immunitaire anti-carbohydate dirigée contre des cellules tumorales du sein et médier leur destruction par un mécanisme dépendant du complément (Kieber-Emmons *et al.*, 1997). Magliani *et al.* (1998) ont démontré qu'un sFv issu d'anticorps anti-idiotypique mimant la conformation d'un antigène capsulaire de streptocoque du groupe B, était capable d'induire non seulement une réponse anticorps mais surtout une mémoire immunitaire.

Nos résultats de séquences nucléotidiques et en acides aminés déduits nous ont permis de démontrer une identité limitée entre la chaîne lourde clonée et les chaînes lourdes humaines et murines, laissant donc supposer que l'essentiel de la spécificité de l'anticorps anti-idiotypique était portée par cette même chaîne lourde. Nous pouvons remarquer que la chaîne légère identifiée est une chaîne λ alors que la grande majorité des chaînes légères de souris ou de rat sont de type κ .

Quant à la construction elle-même, bien que différents peptides "linker" ont pu être expérimentés dans la construction d'autres sFv (Huston *et al.*, 1991), nous avons utilisé classiquement le "linker" (Gly₄Ser)₃. Flexible, il est hydrophile et prévient de toute interaction avec les régions variables dans la conformation de la protéine. De plus, les résidus qui le composent le rendent faiblement antigénique.

Gilliland *et al.* ont publié en 1996 une méthode de clonage rapide et fiable des régions variables d'anticorps dans le but de fabriquer couramment des fragments anticorps simple chaîne recombinant, ce qui montre bien l'accessibilité d'une telle technologie à des fins thérapeutiques ou encore dans le but de les utiliser en tant qu'outils immunologiques. Ce même procédé peut s'avérer d'une grande utilité pour produire des immunoglobulines entières à partir de régions variables clonées dans un vecteur bactérien, car les techniques de criblage de régions variables basées sur l'utilisation de phages sont une source intarissable de séquences (Huse *et al.*, 1989; Mc Cafferty *et al.*, 1990). Leur transfert dans des cassettes baculovirus permettrait la production d'anticorps complets, souhaitables pour certaines applications.

Toujours d'un point de vue moléculaire, il serait intéressant d'envisager sur la base de nos résultats de séquences, une modélisation moléculaire de notre construction afin d'appréhender une structure tridimensionnelle de l'épitope mimé et de caractériser l'interaction des CDR impliqués dans ce complexe.

La nécessité d'obtenir une protéine recombinante biologiquement active en terme de structure, nous a conduit à envisager différents systèmes d'expression. Sa production au niveau de corps d'inclusion chez la bactérie, a impliqué une solubilisation dans des conditions dénaturantes. Malgré l'utilisation de différentes stratégies de renaturation, un seul lot de protéine recombinante s'est avéré conduire à une liaison satisfaisante avec l'anticorps monoclonal IPLSm1.

Bien que des sFv soient couramment produits à des taux importants dans les systèmes bactériens, ils restent souvent insolubles et nécessitent des étapes de renaturation. En théorie, un taux important de protéine recombinante peut être obtenu dans ce système, mais toute une machinerie de glycosylations nécessaires à l'expression d'une structure anticorps fait défaut. Dans certaines circonstances, l'expression de protéine hétérologue chez la bactérie peut lui être toxique, ce qui implique de choisir judicieusement le promoteur d'expression de la protéine recombinante (Goeddel *et al.*, 1990; Pugsley *et al.*, 1989). Cependant, différents protocoles ont pu être expérimentés afin de conduire à une expression satisfaisante ainsi qu'à une renaturation de fragment anticorps produit chez *E. coli* (Cabilly *et al.*, 1989; Buchner *et al.*, 1991). Désormais, la plupart des sFv exprimés en système bactérien sont ciblés vers le périplasme où ils peuvent être obtenus sous une forme active. A cet effet, des séquences spécifiques ("bacterial leader") sont utilisées afin de diriger la protéine de la membrane cytoplasmique vers le périplasme où les ponts disulfures, indispensables à une structure correcte, peuvent se former (Better *et al.*, 1988; Skerra *et al.*, 1988; Pluckthun *et al.*, 1989). Un autre inconvénient de ce système est lié à l'étude de l'antigénicité de la protéine recombinante qui peut être associée, lors de sa production, à des pyrogènes (LPS).

Nous avons pratiqué différentes immunisations chez le rat dans différentes conditions: voies d'administrations, adjuvantité, présentation, notamment sous forme agrégée, favorable à l'immunisation d'anticorps anti-idiotype. Bien que la réponse immune de certains animaux soit spécifique de la construction, le sérum d'un seul rat s'est avéré spécifique de l'épitope glycanique présent à la surface du schistosomule. Cette faible immunogénicité *in vivo* pourrait s'expliquer par la petite taille du sFv, mais elle est aussi propre à l'immunisation par des anticorps anti-idiotypes en général. Une hétérogénéité dans la structure du lot produit ayant servi aux immunisations, cumulée à celle des réponses anticorps succitées, expliqueraient de telles difficultés à induire une réponse spécifique de l'antigène carbohydate d'origine.

Le choix du passage à un système d'expression transitoire en cellules COS-1 a été conforté par des exemples satisfaisants dans l'expression de gènes d'immunoglobuline dans ce système (Whittle *et al.*, 1987). Elles comprennent effectivement toute la machinerie conduisant à l'assemblage d'immunoglobulines, aux modifications post-translationnelles nécessaires et à une sécrétion possible. Dans notre cas, pour un pourcentage de 20% de cellules transfectées, nous n'avons pas détecté d'expression de la protéine recombinante

Dans d'autres systèmes d'expression hétérologues comme celui de la levure, les anticorps fonctionnels qui y ont été obtenus (Hornitz *et al.*, 1988; Better *et al.*, 1989) ont nécessité des contraintes de manipulation telles, qu'elles ne nous ont pas permises de les retenir.

La littérature rapportait de nombreux exemples concernant l'expression d'anticorps simple chaîne biologiquement actif en système baculovirus/cellules d'insectes (Bei *et al.*, 1995; Kretzschmar *et al.*, 1996). Il permet en effet toutes les modifications post-transcriptionnelles eucaryotes avec quelques différences près dans les types de glycosylations (O'Really, 1994). Exprimé dans ce système, notre sFv n'a pas subi de modification ayant une répercussion sur son poids moléculaire, mais sa production s'est avérée plus stable d'un lot à l'autre dans son affinité avec l'anticorps monoclonal IPLSm1. Le problème que nous avons rencontré, résidait cette fois dans la quantité de protéine recombinante fusionnée à la GST obtenue, proportionnellement à la production de GST seule. Les virus non recombinants n'étant pas viables, une autolyse de la protéine fusionnée produite expliquerait ce phénomène.

La comparaison des niveaux de production dans le milieu de culture a révélé qu'il pouvait exister des différences entre les autres types d'anticorps produits dans ce système (Chaabihi, 1998). Ainsi, cet auteur émettait l'hypothèse d'une influence possible de la nature des chaînes variables sur l'efficacité d'assemblage et/ou de sécrétion des sFv recombinants.

L'antigénicité de cet sFv produit dans le système baculovirus/cellules d'insectes a été étudiée chez le rat suite à des immunisations par la technique de Vaitukaitis et en sous-cutanée. Nous avons pu ainsi caractériser dans un nombre limité d'animaux, une réponse strictement d'isotype IgG2a spécifique de la KLH ou de l'antigène furcocercaire. Ce profil isotypique est similaire à celui obtenu chez le seul animal développant une réponse spécifique de l'épitope carbohydrate, suite à une immunisation avec le sFv produit dans le système bactérien. Il correspond également à celui obtenu suite à une seule injection de KLH native, bien que cette approche globale des glycanes portés par cette glycoprotéine ne puisse pas compenser la purification de l'épitope glycanique d'intérêt, dans l'étude de la fonction immunomodulatrice de celui-ci. De plus, nous avons envisagé la restimulation *in vitro* par notre sFv de splénocytes de rat immunisés par de la KLH ou par une fraction enrichie en épitopes carbohydrates d'intérêt, mais sans obtenir de réponse cellulaire significative.

Sur la base de ces résultats obtenus chez un faible nombre d'animaux, différentes perspectives restent à envisager en ce qui concerne l'optimisation de la réponse immunitaire induite *in vivo* vis-à-vis du fragment sFv (utilisation de protéines porteuses, d'adjuvants...). Elles permettront de confirmer la réponse humorale observée, de caractériser les mécanismes cellulaires associés, et enfin, d'appréhender des expériences de protection vis-à-vis du parasite.

Cette approche anti-idiotypique tient son originalité dans les points suivants: **un fragment anticorps simple chaîne peut mimer un épitope carbohydrate parasitaire, et induire une réponse humorale spécifique de *S. mansoni* chez le rat, dans la limite des systèmes d'expression utilisés.**

Elle ouvre également des perspectives fondamentales bien plus larges dans la relation existant entre la nature et la fonction d'un antigène, qui demeure à ce jour peu argumentée.

BIBLIOGRAPHIE

A

- ABEL L., DEMENAI F., PRATA A. *et al.* Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, 48, 959-970.
- ACTOR J.K., MARSHALL M.A., ELTOUM I.A. *et al.* Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: association of viral persistence with egg granuloma formation. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 3050-3056.
- ACTOR J.K., SHIRAI M., KULLBERG M.C. *et al.* Helminth infection results in decreased virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1993, 90, 948-954.
- AGADJANYAN M.G., TRIVEDI N.N., KUDCHODKAR S. *et al.* An HIV type 2 DNA vaccine induces cross-reactive immune responses against HIV type 2 and SIV. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, 1997, 13, 1561-1572.
- ALVAREZ-SILVA M., DASILVA L.C. & BOROJEVIC R. Cell membrane-associated proteoglycans mediate extramedullary myeloid proliferation in granulomatous inflammatory reactions to schistosome eggs. *J. Cell. Sci.*, 1993, 104, 477-484.
- ALVES-BRITO C.F., SIMPSON A.J.G., BAHIA-OLIVEIRA L.M.G. *et al.* Analysis of anti-keyhole limpet haemocyanin antibody in Brazilians supports its use for the diagnosis of acute schistosomiasis mansoni. *Tran. R. soc. Trop. Med. Hyg.*, 1992, 86, 53-56.
- AMIRI P., LOCKSLEY R.M., PARSLAW T.G. *et al.* Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*, 1992, 356, 604-607.
- AMORY-SOISSON L.M., MASTERSON C.P., TOM T D. *et al.* Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J. Immunol.*, 1992, 149, 3612-3620.
- ARMSTRONG S.J. & DIMMOCK M.J. Neutralization of influenza virus by low concentrations of hemagglutinin-specific polymeric immunoglobulin A inhibits viral fusion activity, but activation of the ribonucleoprotein is also inhibited. *J. Virol.*, 1992, 66, 3823-3832.
- ARTHUR R.P. & MASON D. T cells that help B cell responses to soluble antigen are distinguishable from those producing interleukine 2 on mitogenic or allogenic stimulation. *J. Exp. Med.* 1986, 163, 774-786.
- AUGUSTIN A.A., SIM G.K. & BONA C.A. Internal images of antigens within the immune network. *Surv. Immunol. Res.*, 1983, 2, 78-87.
- AURIAULT C., CAPRON M., CESARI I.M. *et al.* Enhancement of eosinophil effector function by soluble factor(s) released by *Schistosoma mansoni* : role of proteases. *J. Immunol.*, 1983a, 131, 464-470.
- AURIAULT C., GRAS-MASSE H.H., PIERCE R.J., *et al.* Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 glutathione-S-transferase and to synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 1918-1924.
- AURIAULT C., PANCRE V., WOLOWCZUK I. *et al.* Cellular immune response and pathology in schistosomiasis. *Parasite*, 1996, 3, 199-208.
- AURIAULT C., PESTEL J., JOSEPH M. *et al.* Interaction between macrophage and *Schistosoma mansoni* schistosomula : role of IgG peptides and aggregates on the modulation of b-glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cell. Immunol.*, 1981, 62, 15-19.

B

- BAGASRA O., FORMAN L.J., HOWEEDY A. *et al.* A potential vaccine for cocaine abuse prophylaxis. *Immunopharmacology*, 1992, 23, 173-179.
- BALLOUL J.M., BOULANGER D., SONDERMEYER P. *et al.* Vaccination of baboons with a P28 antigen of *S.mansoni* expressed in *E.coli*. In: *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites*, New York : Alan R.Liss Inc., 1987a, -77p.
- BALLOUL J.M., GRZYCH J.M., PIERCE R.J. *et al.* A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.*, 1987c, 138, 3448-3453.
- BALLOUL J.M., SONDERMEYER P., DREYER D. *et al.* Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature*, 1987b, 326, 149-153.

- BAN N., ESCOBAR C., GARCIA R. *et al.* Crystal structure of an idiotype-anti-idiotype Fab complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1994, 91, 1604-1608.
- BANIYASH M & ESHHAR Z. Anti-anti-IgE idiotypic antibodies mimic IgE in their binding to the FC ϵ receptor. *Eur. J. Immunol.*, 1987, 17, 1337-1342.
- BAO S., BEAGLEY K. W., ALLANSON M. *et al.* Exogenous IL-6 promotes enhanced intestinal antibody responses in vivo. *Immunol. Cell. Biol.*, 1998, 76, 560-562.
- BARNARD J. A., LYONS R. M. & MOSES H. M. The cell biology of transforming growth factor- β . *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1032, 79-87.
- BARSOUM I.S., KAMAL, K.A., BASSILYH S. *et al.* Diagnosis of human schistosomiasis by detection of circulating cathodic antigen with a monoclonal antibody. *J. Infect. Dis.*, 1991, 164, 1010-1013.
- BAXT B, GARMENDIA A.E. & MORGAN D.O. Characterization of antiidiotypic antibodies generated against foot-and-mouth disease virus neutralizing monoclonal antibodies. *Viral Immunol.*, 1989, 2, 130-138.
- BEAGLEY K. W., ELDRIDGE J. H., LEE F. *et al.* Interleukins and IgA synthesis: Human and murine IL-6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J. Exp. Med.*, 1989, 169, 2133-2148.
- BEAGLEY K.W., ELDRIDGE J.H. & AICHER W.K. Peyer' s patch B cells with memory cell characteristics undergo terminal differentiation within 24 hours in response to interleukin-6. *Cytokine*, 1991, 3, 2, 107-116.
- BEAGLEY K.W., ELDRIDGE J.H., KIYONO H. *et al.* Recombinant murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA-positive Peyer' s patch B cells. *J. Immunol.*, 1988, 141, 2035-2042.
- BEAGLEY K.W., ELDRIDGE J.H., LEE F. *et al.* Interleukins and IgA synthesis: Human and murine IL-6 induce high rates of IgA secretion in IgA-committed B cells. *J. Exp. Med.*, 1989, 169, 2133-2148.
- BENTLEY G.A., BOULOT G., RIOTTOT M.M. *et al.* Three dimensional structure of an idiotope-anti-idiotope complex. *Nature (London)*, 1990, 348, 254-257.
- BERGQUIST N.R. Controlling schistosomiasis by vaccination: A realistic option. *Parasitol. Today*, 1995, 11, 191-194.
- BETTER M. & HORWITZ A.H. Expression of engineered antibodies and antibody fragments in microorganisms. *Methods enzymol.*, 1989, 178, 476-496.
- BETTER M., CHANG C.P., ROBINSON R. *et al.* *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science*, 1988, 240, 1041-1043.
- BIRD R.E., HARDMAN K.D. & JOACOBSON J.W. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 1988, 242, 423-426.
- BOGEN B., JORGENSEN T. & HANNESTAD K. T helper cell recognition of idiotopes on λ 2 light chains of M315 and T952: evidence for dependence on somatic mutation in the third hypervariable region. *Eur. J. Immunol.*, 1985, 15, 278-281.
- BOGGERS J.J., NIBBELING H.A., DEELDER A.M. *et al.* Immunohistochemical and ultrastructural localization of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens processed by the infected host. *Parasitology*, 1996, 112, 537-543.
- BONA C., HOOGHE R., CAZENAVE P.A. *et al.* Cellular basis of regulation of expression of idiotypes II. Immunity to anti-MOPC460 idiotype antibodies increases the level of anti-trinitrophenyl antibodies bearing 460 idiotypes. *J. Exp. Med.*, 1979, 149, 815-823.
- BONA C., LIEBERMAN R., CHIEN C.C. *et al.* Immune response to levan I. Kinetics and ontogeny of anti-levan and anti-insulin antibody response and expression of cross-reactive idiotype. *J. Immunol.*, 1978, 120, 1436-1442.
- BONA C.A. & KOHLER H. Anti-idiotype antibodies and internal images in Monoclonal and anti-idiotypic antibodies: probes for receptor structure and function. Alan R., Liss, New York, 1984, 141-149.
- BONA C.A. Les vaccins du futur. *La recherche*, 1987, 18, 672-682.

- BONA C.A., FINLEY S., WATERS S. *et al.* Anti-immunoglobulin antibodies. III. Properties of sequential antiidiotypic antibodies to heterologous anti- γ -globulins. Detection of reactivity of antiidiotype antibodies with epitopes of Fc fragments (homobodies) and with epitopes and idiotopes (epibodies). *J. Exp. Med.*, 1982, 156, 986-999.
- BONA C.A., GOLDBERG B., METZGER D. *et al.* Anti-immunoglobulin antibodies IV. Crossreaction of antiidiotypic antibodies specific for rabbit and murine anti- α_1 allotype antibodies with Fc fragment of human immunoglobulins. *Eur. J. Immunol.*, 1984, 14, 548-552.
- BONA C.A., HEBER-KATZ E. & PAUL W.E. Idiotypic-anti-idiotypic regulation I. Immunization with a levan-binding myeloma protein leads to the appearance of autoanti(antiidiotype) antibodies and to the activation of silent clones. *J. Exp. Med.*, 1981, 153, 951-967.
- BONA C.A., KANG C.Y., KOHLER H. *et al.* Epibody: the image of the network created by a single antibody. *Immunol. Rev.*, 1986, 90, 115-127
- BONILLA F.A., ZAGHOUBANI H., RUBIN M. *et al.* VK gene usage idiotype expression and antigen binding among clones expressing the VHx24 gene family derived from naive and antiidiotype immune BALB/c mice. *J. Immunol.*, 1990, 145, 616-622.
- BOROS D.L. & LUKACS N.W. The role of egg antigens, cytokines in granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1992, 87, 75-79.
- BOROS D.L. & WARREN K.S. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Exp. Med.*, 1970, 132, 488-507.
- BOROS D.L., TOMFORD R. & WARREN K.S. Induction of granulomatous and elicitation of cutaneous sensitivity by partially purified SEA of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 1977, 118, 373-376.
- BOROS D.L., WARREN K.S. & PELLEY R.P. The secretion of migration inhibitory factor by intact schistosome egg granulomas maintained in vitro. *Nature*, 1973, 246, 224-226.
- BOULANGER D., REID G.D.F., STURROCK R.F. *et al.* Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasit. Immunol.*, 1991a, 13, 473-490.
- BRACIALE T.L. & BRACIALE V.L. Antigen presentation: structural themes and functional variations. *Immunol. Today*, 1992, 12, 124-129.
- BRANN J.M., MARION S., CHARREIRE J. *et al.* Production of Ab2 β antiidiotypic monoclonal antibodies, specific for human hyrotropin receptor. *Cell Immunol.*, 1993, 148, 316-330.
- BRIERE F., BRIDON J.M. & CHEVET D. Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *J. Clin. Invest.* 1994, 94, 97-104.
- BRIERE F., CHEVET D., BRIDON J.M. *et al.* B lymphocytes of patients with complete IgA deficiency secrete IgA in response to interleukin 10. *Nephrologie*, 1996, 17, 5, 289-295.
- BRINDLEY P.J. Relationships between chemotherapy and immunity in Schistosomiasis. *Adv. Parasitol.*, 1994, 34, 133-161.
- BRINKMANN U., PAI L.H., FITZGERALD D.J. *et al.* B3 (Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1991, 88, 8616-8620.
- BROWN J.N. & SMITH T.M. *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*: effects of infection on induction of tryptophan oxygenase in mouse livers. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1977, 57, 257-259.
- BRUCK C., CO S.M., SLAOUI M. *et al.* Nucleic acid sequence of an internal image-gearing monoclonal antiidiotype and its comparison to their sequence of the external antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 6578-6582.
- BRUGGEMANN M., MULLER H.-J. BURGER *et al.* Idiotypic selection of an antibody mutant with changed hapten binding specificity, resulting from a point mutation in position 50 of the heavy chain. *EMBO J.*, 1986, 5, 1561-1566.
- BUATTACHARYA-CHATTERJEE M, CHATTERJEE S.K., VASILE S. *et al.* Idiotype vaccines against human T cell leukemia. *J Immunol.*, 1988, 141, 1398-1403.

- BUCHNER J. & RUDOLPH R. Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab fragments in *Escherichia coli* Biotechnology, 1991, 9, 157-162.
- BUSHARA H.O., BASHIR M.E., MALIK K.H. *et al.* Suppression of *Schistosoma bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione S-transferase or keyhole limpet haemocyanin. Parasite Immunol., 1993, 15, 383-390.
- BUTTERWORTH A., VADAS M.A., WASSOM D.L. *et al.* Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence. J. Exp. Med., 1979b, 150, 1456-1471.
- BUTTERWORTH A.E., BENSTED-SMITH R., CAPRON A. *et al.* Immunity in human schistosomiasis mansoni. Prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. Parasitology, 1987, 94, 281-300.
- BUTTERWORTH A.E., CAPRON M., CORDINGLEY J.S. *et al.* Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals and analysis of their immune responses. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1985, 79, 393-408.
- BUTTERWORTH A.E., STURROCK R.F., HOUBA V. *et al.* Antibody-dependent cell-mediated damage to schistosomula *in vitro*. Nature, 1975a, 252, 503-505.
- BUTTERWORTH A.E., STURROCK R.F., HOUBA V. *et al.* Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. Nature, 1975b, 256, 27-730.
- C**
- CABILLY S. Growth at sub-optimal temperatures allows the production of functional, antigen-binding Fab fragments in *Escherichia coli*. Gene, 1989, 85, 553-557.
- CACALANO N, CLEVELAND W.L & ERLANGER B.F. Characterization of a monoclonal antiidiotypic antibody that mimics cyclosporine A in a single binding system. J. Immunol., 1991, 147, 3012-3017.
- CAPRON A. La bilharziose: du papyrus à l'ordinateur. Le généraliste, 1993, 1411, 8-18.
- CAPRON A. Le langage moléculaire des parasites. Médecine & Sciences, 1995b, 11, 431-433.
- CAPRON A., BIGUET J., ROSE F. *et al.* Les antigènes de *Schistosoma mansoni*. II. Etude immunoelectrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte de *S.mansoni*. Ann. Inst. Pasteur, 1965, 109, 798-810.
- CAPRON A., DESSAINT J.P., CAPRON M. *et al.* Immunity to schistosomes : progress toward vaccine. Science, 1987, 238, 1065-1072.
- CAPRON A., DESSAINT J.P., CAPRON M. *et al.* Involvement of specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. Nature, 1975, 253, 474-475.
- CAPRON M. & CAPRON A. Rats, mice and men - models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. Parasitol. Today, 1986, 2, 69-75.
- CAPRON M., BAZIN H., JOSEPH M. *et al.* Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. J. Immunol., 1981, 126, 1764-1768.
- CAPRON M., CAPRON A., ABDEL-HAFEZ S.K. *et al.* Immunological response of athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. II. Antibody-dependent mechanisms of resistance. J. Immunol., 1983, 131, 1475-1480.
- CAPRON M., CAPRON A., TORPIER G. *et al.* Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. Eur. J. Immunol., 1978, 8, 127-133.
- CAPRON M., NOGUEIRA-QUEIROZ J.A., PAPIN J.P. *et al.* Interactions between eosinophils and antibodies: *In vivo* protective role against rat schistosomiasis. Cell. Immunol., 1984, 83, 1, 60-72.
- CARLIER Y., BOUT D. & CAPRON A. Detection of *Schistosoma mansoni* M antigen in circulating immune-complexes and in kidneys of infected hamsters. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1980, 74, 534-538.
- CARLIER Y., BOUT D. & CAPRON A. Further studies on the circulating M antigen in human and experimental *Schistosoma mansoni* infections. Ann. Immunol., 1978, 129, 811-818.
- CARLIER Y., BOUT D., STRECKER G. *et al.* Purification, immunochemical, and biologic characterization of the *Schistosoma* circulating M antigen. J. Immunol., 1980, 124, 2442-2450.

- CARPENTER G.H., GARRETT J.R., HARTLEY R.H. *et al.* The influence of nerves on the secretion of immunoglobulin A into submandibular saliva in rats. *J. Physiol.*, 1998, 512, 567-573.
- CARTER C.E. & COLLEY D.G. Partial purification and characterization of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen with Con A-Sepharose chromatography. *J. Immunol.*, 1979, 122, 2204-2209.
- CAULFIELD J.P., YUAN H.C. CIANCI C.M.L. *et al.* *Schistosoma mansoni* : development of the cercarial glycocalyx. *Exp. Parasitol.*, 1988, 65, 10-19.
- CAULFIELD J.P., CIANCI C.M., MCDIARMID S.S. *et al.* Ultrastructure, carbohydrate, and amino acid analysis of two preparations of the cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol.*, 1987, 73, 514-522.
- CHAABIHI H. Production d'anticorps dans les cellules d'insectes. In : Ingénierie des anticorps – Banques combinatoires.
- CHANH T.C. & HEWETSON J.F. Protection against ricin intoxication *in vivo* by anti-idiotypic vaccination. *Vaccine*, 1995, 13, 479-485.
- CHANH T.C. RAPPOCCIOLO G. & HEWETSON J.F. Monoclonal antiidiotypic induces protection against the cytotoxicity of the trichothecene mycotoxin T-2. *J. Immunol.*, 1990, 144, 4721-4728.
- CHANTRY D., TURNER M., ABNEY E. *et al.* Modulation of cytokine production by transforming growth factor- β . *J. Immunol.*, 1989, 142, 4295-4300.
- CHEN C., STENZEL-POORE M.P. & RITTENBERG M.B. Natural auto and polyreactive antibodies differing from antigen-induced autoantibodies in the H chain CDR3. *J. Immunol.* 1991, 147, 7, 2359-2367.
- CHEN Z.J., YANG H. & FERRONE S. Human high molecular weight melanoma-associated antigen mimicry by mouse antiidiotypic monoclonal antibody MK2-23. *J. Immunol.*, 1991, 147, 1082-1090.
- CHERWINSKI H.M., SCHUMACHER J.H., BROWN K. D. *et al.* Two types of mouse help T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays and monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 1987, 166, 1229-1244.
- CHIARAMONTES M.G., SCHOPF L.R., NEBEN T.Y. *et al.* IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Immunol.*, 1999, 920-930.
- CLEGG J.A., SMITHERS S.R. & TERRY R.J. Concomitant immunity and host antigens associated with schistosomiasis. *Int. J. Parasitol.*, 1971, 1, 43-49.
- CLEGG, J. A. & SMITHERS, S. R. The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *Intern. J. Parasitol.*, 1972, 2, 79-98.
- CLEVELAND W.L., WASSERMAN N.H., SARANGARAJAN R. *et al.* Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor by normally functioning auto-idiotypic mechanism. *Nature (London)*, 1983, 305, 56-57
- COFFMAN R.L. LEBMAN D.A. & SHRADER B. Transforming growth factor β specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1989, 170, 1039-1044.
- COFFMAN R.L., SHRADER B., CARTY J. *et al.* A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. I. Biologic characterization. *J. Immunol.*, 1987, 139, 3685-3690.
- COHEN I.R. & WEKERLE H. Regulation of auto-sensitization: the immune activation and specific inhibition of self-recognizing thymus-derived lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1973, 137, 224-238.
- COLCHER D., BIRD R., ROSELLI M. *et al.* *In vivo* tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 1990, 82, 1191-1197.
- COLINO J. & OUTSCHOORN I. Dynamics of the murine humoral immune response to *Neisseria meningitidis* group B capsular polysaccharide. *Infection and immunity*, 1998, 66, 505-513.
- COLUCCI G., & WAKSAL S.D. Production of monoclonal antiidiotypes which recognize hepatitis B virus surface antigen. *Eur. J. Immunol.*, 1987, 17, 365-370.
- COSENZA H. & KOHLER H. Specific suppression of the antibody response by antibodies to receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 2701-2705.

COSENZA H. Detection of anti-idiotypic reactive cells in the response to phosphocholine. *Eur. J. Immunol.*, 1976, 6, 114-116.

COUSSINIER-PARIS & DESSEIN A.J. Schistosoma specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are Th0/2. *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25, 2295-2302.

CREPIEUX P. Approche isotypique de la réponse immune spécifique de l'antigène 38 kDa du *Schistosoma mansoni* induite au cours de l'immunisation par l'hémocyanine de *Megathura crenulata* (KLH). Diplôme d'études approfondies. Lille. 1987.

CUMMINGS R.D. & NYAME A.K. Glycobiology of schistosomiasis. *Faseb. J.*, 1996, 10, 838-848.

CURTIS J.E. & HERSH E.M. The human secondary immune response to Keyhole limpet haemocyanin. *Clin. Exp. Immunol.*, 1972, 10, 171-177.

CURTIS J.E., HERSH E.M., HARRIS J.E. *et al.* The human primary immune response to keyhole limpet haemocyanin: interrelationships of delayed hypersensitivity, antibody response and in vitro blast transformation. *Clin. Exp. Immunol.*, 1970, 6, 473-491.

CZOP J.K., GURISH M.F. & KADISH J.L. Production and isolation of rabbit anti-idiotypic antibodies directed against the human. *J. Immunol.*, 1990, 145, 995-1001.

D

DALTON J.P., LEWIS S.A., ARONSTEIN W.S. *et al.* *Schistosoma mansoni* : immunogenic glycoproteins of the cercarial glycocalyx. *Exp. Parasitol.*, 1987, 63, 215-226.

DAMIAN R.T. Common antigens between adult *Schistosoma mansoni* and the laboratory mouse. *J. Parasitol.*, 1967, 53, 60-64.

DAVEAU R.P., SOMMERVILLE J.E & PERRY FELL H. Expression of Ab fragments in E.Coli. *J. Clin. Immunoassay*, 1992, 15, 25-29.

DAVIE J.M., SEIDEN M.V., GREENSPAN N.S. *et al.* Structural correlates of idiotopes. *Annu. Rev. Immunol.*, 1986, 4, 147-165.

DE BAETS M.H., VERSCHUREN J., VAN BREDA P.J.L. *et al.* Experimental autoimmune myasthenia gravis. *Monogr. Allergy*, 1987, 25, 1-4

DE JESUS A.M., ALMEIDA R.P., BACELLAR O. *et al.* Correlation between cell-mediated immunity and degree of infection in subjects living in an endemic area of schistosomiasis. *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23, 152-158.

DE KOZAK Y. & MIRSHAHI M. Experimental autoimmune uveoretinitis: idiotypic regulation and disease suppression. *Int. Ophthalmol.*, 1990, 14 (1), 43-56.

DEAN D.A. *Schistosoma mansoni* : adsorption of human blood group A and B antigens by schistosomula. *J. Parasitol.*, 1974, 60, 260-263.

DEBOSE-BOYD R., NYAME A.K. & CUMMINGS R.D. *Schistosoma mansoni* : Characterization of an alpha 1-3 fucosyltransferase in adult parasites. *Exp. Parasitol.*, 1996, 82, 1-10.

DEELDER A.M., KORNELIS D., VAN MARCK E.A.E. *et al.* *Schistosoma mansoni* : characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster and human infections. *Exp. Parasitol.*, 1980, 50, 16-32.

DEFRANCE T., VANBERVLIET B., BRIERE F. *et al.* Interleukin-10 and transforming growth factor β cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.*, 1992, 175, 671-682.

DEMEURE C.E., RIHET P., ABEL L. *et al.* Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans : influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. *J. Infect. Dis.*, 1993, 168, 1000-1011.

DESSAINT J.P., CAMUS D., FISHER E. *et al.* Inhibition of lymphocyte proliferation by factors produced by *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.*, 1977, 7, 624-629.

DESSEIN A., RIHET P., DEMEURE C. *et al.* Facteurs génétiques et immunologiques déterminant la résistance à la bilharziose en région d'endémie. *Med. Sci.*, 1992, 8, 108.

DICKERSON RE. Base sequence and helix structure variation in B and A DNA. *J. Mol. Biol.*, 1983, 166, 3, 419-441.

DUKEMA R., VAN DER MEIDE P.H., BUBBELD M. *et al.* Cloning, expression and purification of rat IFN γ . *Methods in enzymology*, 1986, 119, 453 - 464.

DINEA L., NEWIRTH S., SCHULMAN J. *et al.* Induction of antihemagglutinin antibodies by polyclonal antiidiotypic antibodies. *Viral Immunol.*, 1993, 6, 75-84.

DISSOUS C., GRZYCH J.M. & CAPRON A. *Schistosoma mansoni* surface antigen defined by a rat monoclonal IgG2a. *J. Immunol.*, 1982, 129, 2232-2234.

DISSOUS C., GRZYCH J.M., & CAPRON A. *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature*, 1986, 323, 443-445.

DISSOUS C., PRATA A. & CAPRON A. Human antibody response to *Schistosoma mansoni* defined by protective monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 1984, 149, 227-233

DISSOUS C. Etude des antigènes de surface de *Schistosoma mansoni*. Caractérisation et molécules impliquées dans l'immunité à la réinfection. Thèse de doctorat en sciences de la vie et de la santé. Lille I, 1984.

DOBRILA L., ANTOHE F., HELTIANU C. *et al.* Albumin binding proteins of endothelial cells identified by antiidiotypic antibodies. *Int. Immunol.*, 1992, 4, 789-796.

DUAN L., BAGASRA O., LAUGHLIN M.A. *et al.* Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev single chain antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 5075-5079.

DUNNE D.W., BUTTERWORTH A.E., FULFORD A.J. *et al.* Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.*, 1992, 22, 6, 1483-1494.

DUNNE D.W., GRABOWSKA A.M., FULFORD A.J.C. *et al.* Human antibody responses to *Schistosoma mansoni*: the influence of epitopes shared between different life-cycle stages on the response to the schistosomulum. *Eur. J. Immunol.*, 1988, 18, 123-131.

DUNNE D.W., LUCAS S., BICKLE Q. *et al.* Identification and partial purification of an antigen (omega 1) from *Schistosoma mansoni* eggs which is putatively hepatotoxic in T-cell deprived mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1981, 75, 54-71.

DUVAUX-MIRET O., STEFANO G.B., SMITH E.M. *et al.* Immunosuppression in the definitive and

intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoreactive neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, 89, 778-787.

DWYER D., VAKIL M. & KEARNEY J.F. Idiotypic network connectivity and possible cause of myasthenia. *J. Exp. Med.*, 1986, 164, 1310-1319.

E

EHRHARDT R.O., STROBER W. & HARRIMAN G.R. Effects of transforming growth factor (TGF) $_{\beta 1}$ on IgA isotype expression. TGF $_{\beta 1}$ induces a small increase in sIgA $^{+}$ cells regardless of the method of B cell activation. *J. Immunol.*, 1992, 148, 3830-3836.

EICHMANN K. ET RAJEWSKY K. Induction of T and B cell immunity by anti-idiotypic antibody. *Eur. J. Immunol.*, 1975, 5, 661-

EICHMANN K. Idiotypic suppression. II. Amplification of a suppressor T cell with antiidiotypic activity. *Eur. J. Immunol.*, 1974, 5, 511-517

EL RIDI R., VELUPILLAI P. & HARN D.A. Regulation of Schistosome egg granuloma formation: host-soluble α -selectin enters tissue-trapped eggs and binds to carbohydrate antigens on surface membranes of miracidia. *Infection and Immunity*, 1996, 64, 4700-4705.

ERTL H.C.J. & BONA C. Criteria to define antiidiotypic antibodies carrying the internal image of an antigen. *Vaccine*, 1988, 6, 80-84.

ERTL H.C.J. & FINBERG R.W. Sendai virus specific T cell clones: Induction of cytolytic T cells by an anti-idiotypic antibody directed against a helper T cell clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1984, 81, 2850-2854.

EUZEBY J. Les Maladies vermineuses des animaux domestiques et leur incidence sur la pathologie humaine. Vigot Frères. 1970.

F

FALLON P.G. & DOENHOFF M.J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 51, 83-88.

G

- FALLON P.G., STURROCK R.F., NIANG A.C. *et al.* Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1995, 53, 61-72.
- FATTAH D., QUINT D.J., PROUDFOOT A. *et al.* In vitro and in vivo studies with purified recombinant human interleukin - 5. *Cytokine*, 1990, 2, 112 - 121.
- FELDMAN M., ZANDERS E.D. & LAMB J.R. Tolerance in T-cell clones. *Immunol. Today*, 1985, 6, 58-62
- FIELDS B., GOLDBAUM F.A., YSERN X. *et al.* Molecular basis of antigen mimicry by an antiidiotype. *Nature*, 1995, 374, 739-742.
- FIorentino D.F., BOND M.W. & MOSMANN T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*, 1989, 170, 2081-2095
- FIorentino D.F., ZLOTNIK A., MOSMANN T.R. *et al.* IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-22.
- FIRESTEIN G.S., ROEDER W.D., LAXER J.A. *et al.* A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J. Immunol.*, 1989, 143, 518-525.
- FISHELSON Z. Novel mechanisms of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 1995, 90, 289-301.
- FLAMM J., BUCHER A., HOLTL W. *et al.* Recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: adjuvant topical chemotherapy versus immunotherapy. A prospective randomized trial. *J. Urol.*, 1990, 144, 260-263.
- FONG S., GILBERSTON T.A., CHEN P.P. *et al.* Modulation of human rheumatoid factor-specific lymphocyte responses with a crossreactive antiidiotype bearing the internal image of antigen. *J. Immunol.*, 1984, 132, 1183-1189.
- FRANCOTTE M. & URBAIN J. Induction of anti-tobacco mosaic virus antibodies in mice by rabbit anti-idiotypic antibodies. *J. Exp. Med.*, 1984, 160, 1485-1494.
- FUJIIHASHI K., MCGHEE J. R., LUE C. *et al.* Human appendix B cells naturally express receptors for and respond to interleukin 6 with selective IgA1 and IgA2 synthesis. *J. Clin. Invest.* 1991, 88, 248-252.
- GALLOWAY C.J., MADANAT M.S., SARR T. *et al.* Anti-tumor necrosis factor receptor and tumor necrosis factor against activity by an antiidiotypic antibody. *Eur. J. Immunol.*, 1992, 22, 3045-3048.
- GAULTON G.N., SHARPE A.H., CHANG D.W. *et al.* Syngeneic monoclonal internal image antiidiotypes as prophylactic vaccines. *J. Immunol.*, 1986, 137, 2930-2936.
- GHEENDLER Y., ARNON R. & FISHELSON Z. Isolation and characterization of Smp156, a novel serine protease inhibitor. *Experimental Parasitology*, 1994, 78, 121-131.
- GILLILAND L.K., NORRIS N.A., MARQUARDT H. *et al.* Rapid and reliable cloning of antibody variable regions and generation of recombinant single chain antibody fragments. *In: Tissue antigens*. Munsgaard, 1996, 47, 1-20.
- GLASEL J.A. & MYERS W.E. Rabbit anti-Id antibodies raised against monoclonal anti-morphine IgG block μ and δ opiate receptor site. *Life Science*, 1985, 36, 2523-2528
- GOEDDEL D.V., Expression in *Escherichia coli*. *In: Methods in enzymology*. San Diego, Academic Press, Inc., 1990, 185, 3.
- GOLDBAUM F.A., VELIKOVSKY C.A., DALL'ACQUA W. *et al.* Characterization of anti-anti-idiotypic antibodies that bind antigen and an anti-idiotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 8697-8701.
- GOLDBERG B., PAUL W.E. & BONA C.A. Idiotype-antiidiotype regulation. IV. Expression of common regulatory idiotopes in fructosan-binding monoclonal immunoglobulin. *J. Exp. Med.*, 1983, 158, 515-528.
- GOLDRING O.L., CLEGG J.A., SMITHERS S.R. *et al.* Acquisition of human blood group antigens by *Schistosoma mansoni*. *Clin. Exp. Immunol.*, 1976, 26, 181-187.
- GREENSPAN N.S. & DAVIES J.M. Serologic and topographic characterization of idiotopes on murine monoclonal anti-streptococcal group A carbohydrate antibodies. *J. Immunol.*, 1985, 134, 1085-1072

H

- GREENSPAN N.S. & MONAFO W.J. Topographic analysis with monoclonal anti-idiotopes: probing the functional anatomy of immunoglobulin variable domains. *Int. Rev. Immunol.*, 1987, 2, 391-417.
- GREZEL D., CAPRON M., GRZYCH J.M. *et al.* Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23, 454-460.
- GRIEDER F.B. & SCHULTZ K.T. Antiidiotypic antibody mimicry of a bluetongue virus neutralizing antigen. *J. Immunol.*, 1990, 144, 2627-2631.
- GRINNELL B.W., HERMANN R.B. & YAN S.B. Human protein C inhibits selectin-mediated cells adhesion : role of unique fucosylated oligosaccharide. *Glycobiology*, 1994, 4, 221-225.
- GRZYCH J.M., CAPRON M., BAZIN H. *et al.* *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-S. mansoni antibodies. *J. Immunol.*, 1982, 129, 2739-2743
- GRZYCH J.M., CAPRON M., DISSOUS C. *et al.* Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.*, 1984, 133, 998-1004.
- GRZYCH J.M., CAPRON M., LAMBERT P.H. *et al.* An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature (London)*, 1985, 316, 74-76.
- GRZYCH J.M., GREZEL D., XU C.B. *et al.* IgA antibodies to a protective antigen in human Schistosomiasis Mansoni. *J. Immunol.*, 1993, 150, 2, 527-535.
- GRZYCH J.M., PEARCE E., CHEEVER A. *et al.* Egg Deposition is the Major Stimulus for the Production of Th2 Cytokines in Murine Schistosoma mansoni. *J. Immunol.*, 1991, 146, 1322-1327.
- GRZYCH, J.M., DISSOUS C., CAPRON M. *et al.* Schistosoma mansoni shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *J. Exp. Med.*, 1987, 165, 865-878.
- HAGAN P., BLUMENTHAL U.J., DUNNE D. *et al.* Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with Schistosoma haematobium. *Nature*, 1991, 349, 243-245.
- HAGAN P., WILKINS H. A., BLUMENTHAL U. J. *et al.* Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasite Immunol.*, 1985, 7, 625-632.
- HALL B.L., ZAGHOUANI H., DAIAN C. *et al.* A single amino acid mutation in CDR3 of the 3-14-9 L chain abolished expression of the Ida 10-defined idiotope and antigen binding. *J. Immunol.*, 1992, 149, 1605-1612.
- HAMBURGER J., LUSTIGMAN S., SIONGOK T.K. *et al.* Analysis and preliminary purification of glycoproteins isolated from eggs in the urine of patients with Schistosoma haematobium infection. *J. Immunol.*, 1982a, 129, 1711-1714.
- HAMBURGER J., LUSTIGMAN S., SIONGOK T.K. *et al.* Characterization of a purified glycoprotein from Schistosoma mansoni eggs : specificity, stability, and the involvement of carbohydrate and peptide moieties in its serologic activity. *J. Immunol.*, 1982b, 128, 1864-1869.
- HAMILTON J.V., FALLON P.G. & DOENHOFF M.J. Immunological cross-reactivity between keyhole limpet haemocyanin (KLH) and *schistosoma mansoni* egg antigens alpha-1 and omega-1. *In* Schistosomiasis : Recent developments in the fields Symposium, university of Wales, Bangor, UK., 1996, 59
- HANG L.M., BOROS D.L. & WARREN K.S. Induction of immunological hyporesponsiveness to granulomatous hypersensitivity in Schistosoma mansoni infection. *J. Infect. Dis.*, 1974, 130, 515-522
- HARN A. Immunization with schistosome membrane antigens. *Acta Trop. Suppl.*, 1987, 12, 46-49.
- HARN D.A., DANKO K., QUINN J.J. *et al.* Schistosoma mansoni : the host immune response to egg antigens. I. Partial characterization of cellular and humoral responses to pI fractions of soluble egg antigens. *J. Immunol.*, 1989, 142, 2061-2066.
- HARN D.A., MITSUYAMA M., & DAVID J.R. Schistosoma mansoni. Anti-egg monoclonal antibodies protect against cercarial challenge in vivo. *J. Exp. Med.*, 1984, 159, 1371-1387.

- HARNETT W. & KUSEL J.R. Increased exposure of parasite antigens on the surface of adult male *schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. *Parasitology*, 1986, 93, 401-405
- HART D.A., WANG A.L., PAWLAK L.L. *et al.* Suppression of idiotypic specificities in adult mice by administration of anti-idiotypic antibody. *J. Exp. Med.*, 1972, 135, 1293-1300
- HASEMANN C.A. & CAPRA J.D. Mutational analysis of the cross-reactive idiotype of the a strain mouse. *J. Immunol.* 1991, 147, 3170-3179.
- HASSERMANN M., BUSCHKO J., FAUSSNER A. *et al.* Antiidiotypic antibodies bearing the internal image of a bradykinin epitope. Production, characterization and interaction with the kinin receptor. *J. Immunol.*, 1991, 147, 3882-3892.
- HAYDEN M.S., LINSLEY P.S., GAYLE M.G. *et al.* Single-chain mono- and bispecific antibody derivatives with novel biological properties and anti-tumor activity from COS cells transient expression system. *Ther. Immunol.*, 1994, 1, 3-15.
- HAYUNGA E.G., SUMNER M.P., DUNCAN J.F. *et al.* Production of anti-idiotypic antibodies as potential immunoreagents for the serological diagnosis of bovine cysticercosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 653, 178-183.
- HERLYN D., ROSS A.H., LLIPOULOS D. *et al.* Induction of specific immunity to human colon carcinoma by antiidiotypic antibodies to monoclonal antibody CD17-1 A. *Eur. J. Immunol.*, 1987, 17, 1649-1652.
- HERLYN D., SEARS H., ILIPOULOS D. *et al.* Anti-idiotypic antibodies to monoclonal antibody CO17-1A. *Hybridoma*, 1986, 5, 51-58.
- HERLYN D., SOMASUNDARAM R., LI W. *et al.* Anti-idiotype cancer vaccines: past and future. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1996, 43 (2), 65-76.
- HICKSTEIN D.D., LOCKSLEY R.M., BEATTY P.C. *et al.* Monoclonal antibodies binding to the human neutrophil C3bi receptor have disparate functional effects. *Blood*, 1986, 67, 1054-1062.
- HOHMANN A, PETERS V., COMACCHIO R. *et al.* Mouse monoclonal antiidiotypic antibodies to HIV P24: Immunochemical properties and internal imagery. *Mol. Immunol.*, 1993, 30, 521-527.
- HOLMBERG D., FORSGREN S., FORNI L. *et al.* Reactions among IgM antibodies derived from normal neonatal mice. *Eur. J. Immunol.*, 1984, 14, 435-441.
- HOMEIDA M.M., ALI H.M., SULAIMAN S.M. *et al.* Measurement of peak blood levels of oltipraz in patients infected with *S.mansoni*: correlation with the drug's antischistosomal action. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1986, 80, 369-371.
- HORAK P. & VAN DER KNAAP W.P.W. Lectins in snail-trematode immune interactions: a review. *Folia Parasitologica*. 1997, 44, 161-172.
- HORAK P. Developmentally regulated expression of surface carbohydrate residues on larval stages of the avian schistosome *Trichobilharzia szidati*. *Folia Parasitologica*, 1995, 42, 255-265.
- HORWITZ A.H., CHANG C.P., BETTER M. *et al.* Secretion of functional antibodies and Fab fragment of yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1988, 85, 8678-8682.
- HUANG J.H., WARD R.E. & KOHLER H. Idiotype antigens (Ab2 α and Ab2 β) can induce *in vitro* B cell proliferation and antibody production. *J. Immunol.*, 1986, 137, 770-776.
- HUSE W.D., SASTRY L., IVERSON S.A. *et al.* Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*, 1989, 246, 1275-1281.
- HUSTON J.S., LEVINSON D., MUDGETT-HUNTER M. *et al.* Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 5879-5883.
- HUSTON J.S., MUDGETT-HUNTER M., TAI M.S. *et al.* Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion protein. *Methods enzymol.*, 1991, 203, 46-88.

I

ISHIDA H., HASTINGS R., THOMPSON-SNIPES L. *et al.* Modified immunological status of anti-IL-10 treated mice. *Cell Immunol.*, 1993, 148, 371-384.

ISLAM K.B., NILSSON L., SIDERAS P. *et al.* TGF-beta-I induces germline transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Int. Immunol.* 1991, 3, 1099-1106.

ISMAIL M.M., TAHA S.A., FARGHALY A.M. *et al.* Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 1994, 24, 685-693.

J

JAMES S.L. & BOROS D.L. Immune effector role of macrophages in experimental schistosomiasis mansoni. *Immunol. Ser.*, 1994; 60, 461-473.

JAMES S.L., COOK K.W. & LAZDINS J.K. Activation of human monocyte-derived macrophages to kill schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro. *J. Immunol.*, 1990, 145, 2686-2690.

JAMES S.L., CORREA-OLIVEIRA R. & LEONARD E.J. Defective vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in P strain mice. II. Analysis of cellular responses. *J. Immunol.*, 1984, 133, 1587-1593.

JANEWAY C.A. & TRAVERS P. Structure the of antibody molecule and immunoglobulin genes *In Immunobiology* New-York Garland Publishing Inc., 1997, 3, 3-38.

JERNE N.K. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol. Inst. Pasteur*, 1974, 125C, 373-389.

JERNE N.K., ROLAND J. & CAZENAVE P.A. Recurrent idiotopes and internal images. *EMBO J.*, 1982, 1, 243-247.

JOHNSTON L.A. & YOSHINO T.P. Analysis of lectin- and snail plasma-binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 1996, 112, 469-479.

JONES P.T., DEAR P.H., FOOTE J. *et al.* Replacing the complementary-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 1986, 321, 522-525.

JOSEPH M., AURIAULT C., CAPRON A. *et al.* A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*, 1983, 303, 810-811.

JOSEPH M., CAPRON A., BUTTERWORTH A.E. *et al.* Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula in vitro : induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens. *Clin. Exp. Immunol.*, 1978, 33, 48-56.

JURINCIC C.D., ENGELMANN U., GASCH J. *et al.* Immunotherapy in bladder cancer with keyhole-limpet hemocyanin: a randomized study. *J. Urol.*, 1988, 139, 723-726.

K

KÄBLE T., MÖHRING K., IKINGER U. *et al.* Intraveikale rezidivprophylaxe beim oberflächlichen harnblasenkarzinom mit BCG und KLH. *Urologe*, 1991, 30, 118-121.

KAGAN I.G. Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. *Rice. Inst. Pamph.*, 1958, 45, 151.

KAHN O., STITES D.P., SCILLIAN J. *et al.* A phase I study of HGP-30, a 30 amino acid subunit of the human immunodeficiency virus (HIV) p17 synthetic peptid analogue sub-unit vaccine in seronegative subjects. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses*, 1992, 8, 1321-1325.

KANG C.Y., NARA P., CHAMAT S. *et al.* Antiidiotypic monoclonal antibodies elicits broadly neutralizing anti-gp120 antibodies in monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 2546-2550.

KARI-GUTTORMSEN H., WETZLZR L.M., FINBERG R.W. *et al.* Immunologic memory induced by a glycoconjugate vaccine in a murine adoptive lymphocyte transfer model. *Infection and Immunity*, 1998, 66, 2026-2032.

KARPATKIN S., NORDI M.A. & KOURI Y.H. Internal-image antiidiotypic HIV-I gp120 antibody in human immunodeficiency virus I (HIV-I)seropositive individuals with thrombocytopenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, 89, 1487-1491.

KASAI K. & HIRABAYASHI J. Galectins : a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J. Biochem.*, 1996, 119, 1-8.

KEARNEY J.F., VAKIL M. & SOLVASON N. The role of idiotypic interactions and B-cell subsets in development of the B-cell repertoire. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1989, 52, 203-207

KELLY C., SIMPSON A.J., FOX E. *et al.* The identification of *Schistosoma mansoni* surface antigens recognized by protective monoclonal antibodies. *Parasite Immunol.*, 1986, 8, 193-198.

- KELSOE G., RETH M. ET RAJEWSKY K. Control of idiotope expression by monoclonal anti-idiotype and idiotope-bearing antibody. *Eur. J. Immunol.*, 1981, 11, 418-423
- KEMP W.M. Ultrastructure of the Cercarienhullen Reaktion of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 1970, 56, 713-723.
- KENNEDY R.C. & DRESSMAN C.R.J. Enhancement of the immune response to hepatitis B surface antigen. In vivo administration of antiidiotype induces anti-HBs that expresses a similar idiotype. *J. Exp. Med.*, 1984, 159, 655-665.
- KENNEDY R.C. DRESSMAN G.R. BUTEL J.S. *et al.* Suppression of in vivo tumor formation induced by simian virus 40 transformed cells in mice receiving antiidiotypic antibodies. *J. Exp. Med.*, 1985, 161, 1432-1449.
- KENNEDY R.C., ADLER-STROTHZ K., BURNS J.W. *et al.* Antiidiotype modulation of herpes simplex virus infection leading to increased pathogenicity. *J. Virol.*, 1984, 50, 951-953.
- KENNEDY R.C., ADLER-STROTHZ K., HENKEL R.D. *et al.* Immune response to hepatitis B surface antigen: enhancement by prior injection of antibodies to the idiotype. *Science*, 1983, 121, 853-855
- KENNEDY R.C., EICHBERG J.W., LANFORD R.E. *et al.* Antiidiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science*, 1986, 232, 220-223
- KHALIFE J., CAPRON M., CAPRON A. *et al.* Immunity in human schistosomiasis. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.*, 1986, 166, 1626-1640
- KHALIFE J., DUNNE D.W., RICHARDSON B.A., *et al.* Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 1989, 142, 4422-4427.
- KHOO K.H., CHATTERJEE D., CAULFIELD J.P. *et al.* Structural characterization of glycopingolipids from the eggs of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Glycobiology*, 1997a, 7, 653-661.
- KHOO K.H., CHATTERJEE D., CAULFIELD J.P. *et al.* Structural mapping of the glycans from the eggs glycoproteins of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* : identification of novel core structures and terminal sequences. *Glycobiology*, 1997b, 7, 663-677.
- KHOO K.H., SARDA S., XU X. *et al.* A unique multifucosylated 3GalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1-motif constitutes the repeating unit of the complex O-glycans derived from the cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 17114-17123.
- KIEBER-EMMONS T., LUO P., QIU J. *et al.* Peptide mimicry of adenocarcinoma-associated carbohydrate antigens. *Hybridoma*, 1997, 16 (1), 3-10.
- KIM B.S. Mechanisms of idiotype suppression. II. Requirement of specific antigen for B-cell inactivation by anti-idiotype antibody. *J. Immunol.*, 1979, 123, 2499-2504
- KO A., DRAGER U.C. & HARN D.A. A *Schistosoma mansoni* epitope recognized by a protective monoclonal antibody is identical to the stage-specific embryonic antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1990, 87, 4159-4163.
- KORTT A.A. Recombinant antineuraminidase single chain Fv antibody: characterization, formation of dimer and higher molecular mass multimers and the solution of the crystal structure of the scFv-neuraminidase complex. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 23, 206-211.
- KÖSTER B. & STRAND M. *Schistosoma mansoni* : immunolocalization of two different fucose-containing carbohydrate epitopes. *Parasitology*, 1994, 108, 443-446.
- KÖSTER B., HALL M.R. & STRAND M. *Schistosoma mansoni*: immunoreactivity of human sera with the surface antigen Sm23. *Exp. Parasitol.*, 1993, 77, 3, 282-294.
- KREITMAN R.J., CHAUDHARY V.K., WALDMANN T. *et al.* The recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-*Pseudomonas* exotoxin 40 is cytotoxic toward peripheral blood malignant cells from patients with adult T-cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 8291-8295.
- KRESINA T.F. & OLDS G.R. Antiidiotypic antibody vaccine in murine Schistosomiasis *mansoni*. Comprising the internal image of antigen. *J. Clin. Invest.*, 1989, 83, 912-920.
- KRUGER F.J. Frequency and possible consequences of hybridization between *Schistosoma haematobium* and *S. matthei* in the Eastern Transvaal Lowveld. *J. Helminthol.*, 1990, 64, 333-336

KU H.H., CLEVELAND W.L. & ERLANGER B.F. Monoclonal antibodies to adenosine receptor by an antiidiotypic approach. *J. Immunol.*, 1987, 136, 2376-2384.

KULLBERG M.C., PEARCE E.J., HIENY S.E. *et al.* Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. *J. Immunol.*, 1992, 148, 10, 3264-3270.

KUNIMOTO D.Y., NORDAN R.P., & STROBER W. IL-6 is a component cofactor of IL-1 in IgM synthesis and of IL-5 in IgA synthesis. *J. Immunol.*, 1989, 143, 2230-2235.

KUNKEL H.G., MANNIK M. & WILLIAMS R.C. Individual antigenic specificities of isolated antibodies. *Science (Washington)*, 1963, 140, 1218-1219.

L

LAMARRE A. LECOMTE J. & TALBAT P.J. Antiidiotypic vaccination against murine coronavirus infection. *J. Immunol.*, 1991, 147, 4256-4262.

LAMBERTUCCI J.R., GERSPACHER-LARA R., PINTO-SILVA R.A. *et al.* The Queixadilha Project : morbidity and control of Schistosomiasis in an endemic area in the northeast of Minas Gerais, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 1996, 29, 127-135.

LAMBRIS J.D. & ROSS G.D. Characterization of the lymphocyte membrane receptor for Factor H (β 1H-globulin) with an antibody to anti-factor H idiotype. *J. Exp. Med.*, 1982, 155, 1400-1411.

LAMM M.E., NEDRUD J.G., KAETZEL C.S. *et al.* IgA and mucosal defense. *APMIS.*, 1995, 103, 241-246.

LARIVIERE M. Epidémiologie des bilharzioses humaines. *La Revue du Praticien*, 1993, 43, 417-423.

LASSOUED K., DANON F. & BROUET J.C. Human autoantibodies to lamin B receptor are also antiidiotypic to certain anti-lamin B antibodies. *Eur. J. Immunol.*, 1991, 21, 959-962.

LEBMAN D.A., LEE F.D. & COFFMAN R.L. Mechanism for transforming growth factor β and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J. Immunol.*, 1990, 144, 952-959.

LEU J.G., CHEN B.X., DIAMANDUROS A.W. *et al.* Idiotype mimicry and the assembly of a supramolecular structure. An antiidiotypic antibody that mimics taxols in its tubulin-microtubule interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1994, 91, 10690-10694.

LEVERY S.B., WEISS J.B., SALYAN M.E. *et al.* Characterization of a series of novel fucose-containing glycosphingolipid immunogens from eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 5542-5551.

LI Y., ROSS A.G., HE Y.K. *et al.* Serological diagnosis of *Schistosoma japonicum* infections in China. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1997, 1, 19-21.

LIN Y., SHOCKETT P. & STAVNEZER J. Regulation of the antibody class switch to IgA. *Immunol. Res.*, 1991, 10, 376-380.

LIPING C., VIANA L.G., MELO GARCIA T.C. *et al.* The serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis japonica using IgA antibody to egg antigen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1996, 91, 751-754.

LOMBES M., EDELMAN I.S. & ERLANGER B.F. Internal image properties of a monoclonal autoantiidiotypic antibody and its binding to aldosterone receptors. *J. Biol. Chem.*, 1989, 268, 2528-2536.

LUBAHN B.C. & REISNER H.M. Characterization of monoclonal antiidiotypic antibodies to human anti-factor VII antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1990, 87, 8232-8236.

LUND-JOHANSEN F., OLWEUS J., JOREJSI V. Activation of human phagocytes through carbohydrate antigens CD15, sialyl-CD15, CDw17, and CDw65. *J. Immunol.*, 1992, 148, 3221-3229.

LUSTIGMAN S., MAHMOUD A.A.F. & HAMBURGER J. Glycopeptides in soluble egg antigen of *Schistosoma mansoni* : isolation, characterization and elucidation of their immunochemical and immunopathological relation to the major egg glycoprotein (meg). *J. Immunol.*, 1985, 134, 1961-1967.

LYCKE N., ERIKSEN L. & HOLMGREN J. Protection against cholera toxin after oral immunization is thymus-dependent and associated with intestinal production of neutralizing IgA antitoxin. *Scand. J. Immunol.*, 1987, 25, 413-419.

M

- MACHADO A.J., GAZZINELLI G., PELLEGRINO J. *et al.* *Schistosoma mansoni*: the role of the complement C3-activating system in the cercaricidal action of normal serum. *Exp. Parasitol.*, 1975, 38, 20-29.
- MACKNIGHT A.J., BARCLAY A.N., & MANSON D.W. Molecular cloning of interleukin 4 cDNA and analysis of the cytokine repertoire of subsets of CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.*, 1991, 21, 1187 - 1194.
- MADDISON S.E., NORMAN L., GEIGER S.J. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection in the rat. I. Worm burden and serological response in infected, reexposed and antigen sensitized animals. *J. Parasitol.*, 1970, 56, 1058-1065.
- MAGE R. & DRAY S. Persistent altered phenotypic expression of allelic γ G-immunoglobulin allotypes in heterozygous rabbits exposed to isoantibodies in fetal and neonatal life. *J. Immunol.*, 1965, 95, 525-535
- MAGLIANI W., POLONELLI L., CONTI S. *et al.* Neonatal mouse immunity against group B streptococcal infection by maternal vaccination with recombinant anti-idiotypes. *Nat. Med.*, 1998, 4, 705-709.
- MAJUMBAR A.S. & GHOSE A.C. Evaluation of the biological properties of different classes of human antibodies in relation to cholera. *Infect. Immun.*, 1981, 32, 9-14.
- MANGOLD B.L. & DEAN D.A. The role of IgG antibodies from irradiated cercaria-immunized rabbits in the passive transfer of immunity to schistosoma mansoni-infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1992, 47, 821-829.
- MANSOUR M.H. Evidence for a family of schistosome glycan-binding lectins in *Biomphalaria alexandrina*. *Dev. Comp. Immunol.*, 1995, 19, 365-376.
- MANSOUR M.H. Purification and characterization of SM 37 : a fucosyllactose determinant-bearing glycoprotein probed by a *Biomphalaria alexandrina* lectin on adult male schistosomes. *J. Parasitol.*, 1996, 82, 586-593.
- MANSOUR M.H., NEGM H.I., SAAD A.H. *et al.* Characterization of *Biomphalaria alexandrina*-derived lectins recognizing a fucosyllactose-related determinant on schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1995, 69, 173-184.
- MANSOUR M.M., ALI P. O., FARID Z. *et al.* Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis mansoni by antibody responses to keyhole limpet hemocyanin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1989, 41, 338-344.
- MARASCO W.A. & BECKER E.L. Antiidiotype as antibody against formyl peptide chemotaxis receptor of the neutrophil. *J. Immunol.*, 1982, 128, 963-968.
- MARASCO W.A., HASELTINE W.A. & CHEN S.Y. Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 7889-7893.
- MARIKOVSKY M., ARNON R. & FISHELSON Z. Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *J. Immunol.*, 1988b, 141, 273-278.
- MASSAGUE J. The transforming growth factor- β family. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1990, 6, 597-641.
- MATTSON J.R. ROBERTS M. & PATTERSON R. Respiratory immune response to aerosolized keyhole limpet hemocyanin in primate lungs. *Infect. Immun.*, 1974, 9, 708-713.
- MAYER R., IOANIDES C., MORAN T. *et al.* Effect of syngeneic antiidiotypic antibody on influenza virus neuraminidase antibody response. *Viral Immunol.*, 1987, 1, 121-134.
- MAZANEC M.B., NEDRUD J.G., KAETZEL C.S. *et al.* A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol. Today*, 1993, 14, 9, 430-434.
- MAZINGUE C., CAMUS D., DESSAINT J. P. *et al.* *In vitro* and *in vivo* inhibition of mast cell degranulation by a factor from *Schistosoma mansoni*. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immun.*, 1980, 63, 178-189.
- MAZINGUE C., DESSAINT J.P., SCHMITT-VERHULST A.M. *et al.* Inhibition of cytotoxic T lymphocytes by a schistosome-derived inhibitory factor is dependent of an inhibition of the production of interleukin 2. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol.*, 1983, 72, 22-29.
- MAZINGUE C., STADLER B., QUATANNENS B. *et al.* Schistosome-derived inhibitory factor: an immunosuppressive agent preferentially active on

- MILLER K.J., KENNEDY E.P. & REINHOLD V.N. Osmotic Adaptation by Gran-Negative Bacteria : Possible Role for Periplasmic Oligosaccharides. *Science*, 1986, 231, 48-51.
- MIULLER F., AUKRUST P., NILSSEN D.E. *et al.* Reduced serum level of transforming growth factor-beta in patients with IgA deficiency. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1995, 76, 203-208.
- MOFANO W.J., GREENSPAN N.S., CEBRA-THOMAS J.A. *et al.* Modulation of the murine immune response to streptococcal group A carbohydrate by immunization with monoclonal antiidiotope. *J. Immunol.*, 1987, 139, 2702-2707.
- MOLONEY N. A., HINCHCLIFFE P. & WEBBE G. Loss of resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* in mice after treatment with praziquantel. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 81, 247-254.
- MORRISON S.L., JOHNSON M.J., HERZENBERG L.A. *et al.* Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81 (21), 6851-6855.
- MOSMANN T.R., CHERWINSKI H., BOND M.W. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 1986, 136, 2348-2357.
- MOYLE W.R., EHRLICH P.H. & CANFIELD R.E. Use of monoclonal antibodies to subunits of gonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 2245-2248.
- MURRAY P.D., MCKENZIE D.T., SWAIN S.L. *et al.* Interleukin-5 and interleukin-6 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J. Immunol.*, 1987, 139, 2669-2674.
- MWATHA J.K., KIMANI G., KAMAU T. *et al.* High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN- γ , but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.*, 1998, 160, 1992-1999.
- NASH T.E., OTTESEN E.A. & CHEEVER A.W. Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosoma gut. II. Modulation of antibody response. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1978, 27, 944-950.
- NDHLOVU P., CADMAN H., GUNDERSEN S. *et al.* Circulating anodic antigen (CAA) levels in different age groups in a Zimbabwean rural community endemic for *Schistosoma haematobium* determined using the magnetic beads antigen-capture enzyme-linked immunoassay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1996, 54, 537-542.
- NEGM H.I. Characterization of fucosylactose determinant-bearing glycoproteins probed by a *Biomphalaria alexandrina* lectin in *Schistosoma mansoni* cercariae. *Dev. Comp. Immunol.*, 1996, 20, 87-96.
- NITA-LAZAR M. Etude biochimique et immunologique d'un épitope glucidique commun à *Schistosoma mansoni* et à l'hémocyanine de *Megathura crenulata* (mollusque gastéropode). DEA Biologie-Santé, Université des Sciences et Technologies de Lille 1, 1995.
- NISONOFF A. & LAMOYI E. Implications of the presence of an internal image of the antigen in antiidiotypic antibodies: Possible application to vaccine production. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1981, 21, 397-406.
- NORDEN A.P. & STRAND M. *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* : identification of genus- and species-specific antigenic egg glycoproteins. *Experiment. Parasitol.*, 1984, 58, 333-344.
- NORDLING C., HOLMDAHL R. & KLARESKOG L. Down-regulation of collagen arthritis after in vivo treatment with a syngenic monoclonal anti-idiotypic antibody to a cross-reactive idiotope on collagen II auto-antibodies. *Immunology*, 1991, 72, 486-490.
- NORTH R.J., DYE E.S., MILLS C.D. *et al.* Modulation of antitumor immunity-immunobiologic approaches. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1982, 5, 193-220.
- NUDEL U., ZAKUT R., SHANI M. *et al.* The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta actin gene. *Nucleic. Acids. Res.*, 1983, 11, 1759 - 1771.
- NYAME A.K., CUMMINGS R.D. & DAMIAN R.T. Characterization of the high mannose asparagine-linked oligosaccharides synthesized by

Schistosoma mansoni adult male worms. Mol. Biochem. Parasitol., 1988, 28, 265-274.

NYAME A.K., CUMMINGS R.D. & DAMIAN R.T. *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing terminal O-linked N-acetylglucosamine residues. J. Biol. Chem., 1987, 262, 7990-7995.

NYAME A.K., DEBOSE-BOYD R., LONG T.D. *et al.* Expression of Lex antigen in *Schistosoma japonicum* and *S.haematobium* and immune responses to Lex in infected animals: lack of Lex expression in other trematodes and nematodes. Glycobiology, 1998, 8, 615-524.

NYAME A.K., PILCHER J.B., TSANG V.C.W. *et al.* Rodents infected with *Schistosoma mansoni* produce cytolytic IgG and IgM antibodies to the Lewis x antigen. Glycobiology, 1997, 7, 207-215.

NYAME A.K., PILCHER J.B., TSANG V.C.W. *et al.* *Schistosoma mansoni* Infection in Humans and Primates Induces Cytolytic Antibodies to Surface Le^x Determinants on Myeloid Cells. Experiment. Parasitol., 1996, 82, 191-200.

NYINDO M., BORUS P.K., FARAH I.O. *et al.* *Schistosoma mansoni* in the Baboon: Modulation of pathology after vaccination with polyclonal anti-idiotypic antibodies. Scand. J. Immunol., 1995, 42, 637-643.

O

O'REILLY D.R., MILLER L.K. & Luckow V.A. Review of post-translational modification in baculovirus infection. In: Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. New-York, ed. Oxford University Press, 1994, 221-225.

OI VT, VUONG TM, HARDY R. *et al.* Correlation between segmental flexibility and effector function of antibodies. Nature, 1984, 307, 136-140.

OKADA M., SAKAGUCHI N. & YOSHIMURA N.B. Cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. J. Exp. Med., 1983, 157, 583-590.

OMER-ALI P., MANSOUR M., WOODY J.N. *et al.* Antibody to carbohydrate and polypeptide epitopes on the surface of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in Egyptian patients with acute and chronic schistosomiasis. Parasitology, 1989, 98, 417-424.

OMER-ALI P., MAGEE A.I., KELLY C. *et al.* A major role for carbohydrate epitopes preferentially recognized by chronically infected mice in the determination of *Schistosoma mansoni* schistosomulum surface antigenicity. J. Immunol., 1986, 137, 3601-3607.

OMER-ALI P., SMITHERS S.R., BICKLE Q. *et al.* Analysis of the anti-*Schistosoma mansoni* surface antibody response during murine infection and its potential contribution to protective immunity. J. Immunol., 1988, 140, 258-264.

OSWALD I.P., ELTOUM I., WYNN T.A. *et al.* Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*, through the production of nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 999-1003.

LOUDIN M.J. & MICHEL M. Une nouvelle forme d'allotypie des globulines γ du s rum de lapin, apparemment liée   la fonction et   la spécificité anticorps. 1963, C.R. Acad. Sci. (Paris), 257, 805-808.

P

PANCRE V., WOLOCZUK I., BOSSUS M. *et al.* Evaluation of the effect of Sm 28GST-derived peptides in murine hepatosplenic schistosomiasis: interest of the lipopeptidic form of the C-terminal peptide. Mol. Immunol., 1994b, 31, 1247-1256.

PAPP I., WIEDER K.J., SABLINSKI T. *et al.* Evidence for functional heterogeneity of rat CD4⁺ T cells *in vivo*. Differential expression of IL-2 and IL-4 mRNA in recipients of cardiac allografts. J. Immunol., 1992, 148, 1308-1314.

PAPPAS P.W. & REAL C.P. Membrane transport in helminth parasites: a review. Exp. Parasitol., 1975, 37, 469-530.

PAWLAK L.L., HART D.A. & NISONOFF A. Requirements for prolonged suppression of an idiotypic specificity in adult mice. J. Exp. Med., 1973, 137, 1442-1458.

PEARCE E.J., CHEEVER A., LEONARD S. *et al.* *Schistosoma mansoni* in IL-4-deficient mice. Internat. Immunol., 1996, 8, 435-444.

PEARCE E.J. Proselytizing with immunity. Nature, 1993, 363, 6424, 19-20.

PEARCE E.J., CASPAR P., GRZYCH J.M. *et al.* Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. J. Exp. Med., 1991, 173, 159-166.

- PEARCE E.J., JAMES S.L., HIENY S. *et al.* Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 1988, 5678-5682.
- PEREZ M.D., HYAKUTAKE S., AREAS J.A. *et al.* Parasitological survey, with special reference to schistosomiasis mansoni, conducted in the region of Jacupiranga (Ribeira valley, State of Sao Paulo). Survey of the location and distribution of planorbidian snails in the State of Sao Paulo. *Source Rev Farm Bioquim Univ Sao Paulo*, 1975, 13, 401-415.
- PEROSA F. & FERONE S. Murine antiidiotypic monoclonal antibodies that bear the internal image of HLA-DR allospecificities. *J. Clin. Invest.*, 1989, 84, 907-914.
- PFÄFFENBACH G., LAMM M.E., & GIGLI I. Activation of the guinea pig alternative complement pathway by mouse IgA immune complexes. *J. Exp. Med.*, 1982, 155, 231-247.
- PHILLIPS S.M., BENTLEY A.G., LINETTE G. *et al.* The immunologic response of congenitally athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. I. *In vivo* studies of resistance. *J. Immunol.*, 1983, 131, 1466-1474.
- PLUCKTHUN A. & SKERRA A. Expression of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, 1989, 178, 497-515.
- POCKLEY A.G. & MONTGOMERY P.C. In vivo adjuvant effect of interleukins 5 and 6 on rat tear IgA antibody responses. *Immunology*, 1991, 73, 19-23.
- POLONELLI L., CONTI S., GERLONI M. *et al.* « Antibodies »: antibiotic-like anti-idiotypic antibodies. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1991, 29 (4), 235-242.
- POLONELLI L., DE BERNARDIS F., CONTI S. *et al.* Human natural yeast killer toxin-like candidacidal antibodies. *J. Immunol.*, 1996, 156 (5), 1880-1885.
- POLONELLI L., DE BERNARDIS F., CONTI S. *et al.* Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.*, 1994, 152 (6), 3175-3182.
- POLONELLI L., LORENZINI R., DE BERNARDIS F. *et al.* Idiotypic vaccination: immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity. *Scand. J. Immunol.*, 1993, 37 (1), 105-110.
- POTOCNIAK P., ZAVALA F., NUSSENZWEIG R. *et al.* Inhibition of idiotype-anti-idiotype interaction for detection of a parasite antigen: a new immunoassay. *Science*, 1982, 215, 1637-1639.
- POULAIN-GODEFROY O., GAUBERT S., LAFITTE S. *et al.* Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis: stimulatory role of egg antigens. *Infect. Immun.*, 1996, 64, 763-768.
- POWELL M.R. & COLLEY D.G. Demonstration of splenic auto-anti-idiotypic plaque forming cells in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 1985, 134, 4140-4145
- PUCETTI A., MIGLIORINI P., SABBANGA J. *et al.* Human and murine anti-DNA antibodies induce the production of antiidiotypic antibodies with autoantigen binding properties (epibodies) through immune network interactions. *J. Immunol.*, 1990, 145, 4229-4237
- PUGSLEY A.P. Protein targeting. San Diego, Academic Press, Inc., 1989.

R

RABELLO A.L.T., GARCIA M.M.A., PINTO DA SILVA R.A. *et al.* Humoral immune responses in acute schistosomiasis mansoni : relation to morbidity. *Clin. Infect. Dis.*, 1995, 21, 608-615.

RABELLO A.L.T., GARCIA M.M.A., PINTO DA SILVA R.A. *et al.* Humoral immune responses in patients with acute *Schistosoma mansoni* infection who were followed up for two years after treatment. *Clin. Infect. Dis.*, 1997, 24, 304-308.

RADBRUCH A., ZAISS S., KAPPEN C. *et al.* Drastic change in idiotypic but not antigen-binding specificity of an antibody by a single amino-acid substitution. *Nature (London)*, 1985, 315, 506-508.

RAFFERTY D.E. & MONTGOMERY P.C. The effects of transforming growth factor- β and interleukins 2, 5 and 6 on immunoglobulin production in cultured rat salivary gland tissues. *Oral. Microbiol. Immunol.*, 1995, 10, 81-86.

RAMASWAMY K. & BEFUS D. Pulmonary inflammation in parasitic infection : immunoglobulins in bronchoalveolar washings of rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasite Immunol.*, 1989, 11, 655-665.

- RAMSAY A. J., HUSBAND A. J., RAMSHAW I. A. *et al.* The role of interleukin-6 in mucosal IgA responses in vivo. *Science*, 1994, 264, 561-563.
- RAMSAY A.J., BAO S., BEAGLEY K.W. *et al.* Cytokine gene knockout mice – Lessons for mucosal B-cell development. In *Essentials of mucosal immunology*. San Diego : Academic Press. Inc., 1996, p. 247.
- RAMSAY A.J. & KOHONEN-CORISH M. Interleukin-5 expressed by a recombinant virus vector enhances specific mucosal IgA responses *in vivo*. *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23, 3141-3145.
- RAMSAY A.J. & KOHONEN-CORISH M. Interleukin-5 expressed by a recombinant virus vector enhances specific mucosal IgA responses in vivo. *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23, 3141-3145.
- RASMUSSEN K.R., HILLYER G.V. & KEMP W.M. Isolation and partial characterization of an antigen shared between *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, and *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, 1985, 71, 792-798.
- RAYCHANDHURI S., SAEKI Y., CHEN J.J. *et al.* Tumor-specific idiotype vaccine. *J. Immunol.*, 1987, 139, 271-278.
- REALE M.A., MANHEIMER A.J. & MORAN T.M.,. Characterisation of monoclonal antibodies specific for sequential influenza A/PR/8/34 virus variants. *J. Immunol.*, 1986, 137, 1352-1358.
- REGAN K.J., WUNNER W.H. WIKTOR T. *et al.* Antiidiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to rabies virus glycoproteins. *J. Virol.*, 1983, 48, 660-666.
- REYNOLDS S.R., SHOEMAKER C.B. & HARN D.A.T and B cell epitope mapping of Sm23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 1992, 149, 3995-4001.
- RICHARD-LENOBLE D., KOMBILA M., DUONG T.H. *et al.* Bilharziose à *Schistosoma intercalatum*, bilharziose récente et oubliée. *La Revue du Praticien*, 1993, 42, 432-439.
- RICHARDS C.S. & SHADE P.C. The genetic variation of compatibility in *biomphalaria glabrata* and *schistosoma mansoni*. *J. Parassitol.*, 1987, 73, 1146-1151.
- RICHARDS C.S., KNIGHT M. & LEWIS F.A. Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol. Today*, 1992, 8, 171-174.
- RICHTER D., INCANI R.N. & HARN D. A. Lacto-N- Fucopentaose III (Lewis^X), a traquet of the antibody in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity*, 1996, 64, 1826-1831.
- RIECHMANN L., CLARK M., WALDMANN H. *et al.* Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, 1988, 332, 323-327.
- RIHET P., DEMEURE C.E., BOURGOIS A. *et al.* Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur. J. Immunol.*, 1991, 21, 11, 2679-2686.
- RIHET P., DEMEURE C.E., DESSEIN A.J. *et al.* Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4 revealed a new methodology in subjects from a *Schistosoma mansoni* endemic area. *Eur. J. Immunol.*, 1992, 22, 2063-2070.
- RIVERA-MARRERO C. & HILLYER G.V. Isolation and partial characterization of shared antigens of *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* and their evaluation by the ELISA and the EITB. *J. Parasitol.*, 1985, 71, 547-555.
- ROBERTS M., BUTTERWORTH A.E., KIMAGI G., *et al.* Immunity after treatment of human schistosomiasis : association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect. Immunity*, 1993, 61, 4984-4993.
- RODKEY L.S. Studies of idiotypic antibodies. Production and characterization of auto-antiidiotypic antisera. *J. Exp. Med.*, 1974, 139, 712-715.
- ROGUSKA M.A., PEDERSEN J.T., KEDDY C.A. *et al.* Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 969-973.
- ROITT I.M., MALE D.K., GUARNOTTA G. *et al.* Idiotype networks and their possible exploitation for manipulation of the immune response. *Lancet*, 1981, 1, 1041-1045.
- ROITT I.M., THANAVALA Y.M., MALE D.K. *et al.* Anti-idiotypes as surrogate antigens: structural considerations. *Immunol. Today*, 1985, 6, 265-267
- ROLF J.M., GAUDIN H.M., TIRRELL S.M. *et al.* Antiidiotypic antibodies that protect cells against the action of diphtheria toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989, 86, 2036-2039.

- ROSA BRUNET L., FINKELMAN F.D., CHEEVER A.W. *et al.* IL-4 protects against TNF- α mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J. Immunol.*, 1997, 159, 777-785.
- ROTH C., ROCCA-SERRA J., SOMME G. *et al.* Gene repertoire of the anti-poly(Glu60Ala30Tyr10) (GAT) immune response: comparison of VH, V kappa, and D regions used by anti-GAT antibodies and monoclonal antibodies produced after anti-idiotypic immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1985, 82, 4788-4792.
- ROUGEON F. La diversité des anticorps. La recherche, 1986, 17, 680-689.
- ROUX K.H., MONAFO W.J., DAVIE J.M. *et al.* Construction of an extended three-dimensional idiotope map by electron microscopic analysis of idiotope-anti-idiotope complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 4984-4988.
- RUBINSTEIN L.J., GOLDBERG B., HIernaux J. *et al.* Idiotype-antiidiotype regulation V. The requirement for immunization with antigen and monoclonal antiidiotypic antibodies for the activation of β -6 and β -1 polyfructosan reactive clones in BALB/c mice treated at birth with minute amounts of anti-A48 idiotype antibodies. *J. Exp. Med.*, 1985, 158, 1129-1144.
- RUBINSTEIN L.J., YEH M. & BONA C.A. Idiotype-antiidiotype network . II. Activation of silent clones by treatment at birth with idiotopes is associated with the expansion of idiotype-specific helper T cells. *J. Exp. Med.*, 1982, 156, 506-521.
- S**
- SACHS D.L. Induction of protective immunity using antiidiotypic antibodies: Immunization against experimental trypanosomiasis. In: Kohier H. Urbain J, Cazenave PA, Eds. *Idiotypy in Biology and Medicine*. New York: Academic Press, 1984, 401-416.
- SACKS D.L., ESSER K. & SHER A. Immunization of mice against African trypanosomiasis using anti-idiotypic antibodies. *J. Exp. Med.*, 1982, 155, 1108-1119
- SAEKI V., CHEN J.J., SHI L. *et al.* Characterisation of regulatory idiotype-specific T cell clones to a monoclonal antiidiotypic antibody mimicking a tumor associated antigen. *J. Immunol.*, 1983, 142, 1046-1056.
- SALEK M.N., STAPLETON J.D., KHAZAEI M.B. *et al.* Generation of a human antiidiotypic antibody that mimics the GD2 antigen. *J. Immunol* 151:3390-3398. 1993.
- SALVAGGIO J., CASTRO-MURILLO E. & KUNDUR V. Immunologic response of atopic and normal individuals to keyhole limpet hemocyanin. *J. Allergy*, 1969, 44, 344-354.
- SAMUELSON J.C. & CAULFIELD J.P. Cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni* activates human complement. *Infect. Immun.*, 1986, 51, 181-186.
- SAMUELSON J.C., CAULFIELD J.P. The cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *J. Cell Biol.*, 1985, 100, 1423-1434.
- SARAFATI M, DUNCAN D & DELESPESE C. Production and characterization of rabbit antiidiotypic antibodies specific to mouse monoclonal anti-human IgE and reaching with IgE binding factors and lymphocyte receptors for IgE. *Eur. J. Immunol.*, 1981, 16, 325-331.
- SASAKI T., MURYOI T., TAKAI O. *et al.* Binding specificity of anti-idiotypic autoantibodies to anti-DNA antibodies in humans. *J. Clin. Invest.* 1988, 83, 748-754.
- SCHICK M.R., DREESMAN G.R. & KENNEDY R.D. Induction of an anti-hepatitis B surface antigen response in mice by non-internal image Ab2 α antiidiotypic antibodies. *J. Immunol.*, 1987, 138, 3419-3425.
- SCHIFF C., MILILI M., HUE I. *et al.* Genetic basis for expression of the idiotypic network. One unique Ig VH germline gene accounts for the major family of Ab1 and Ab3 (Ab1') antibodies of the GAT system. *J. Exp. Med.*, 1986, 163, 573-587.
- SCHILLING J., CLEVINGER B., DAVIE J.M. *et al.* Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments. *Nature (London)*, 1980, 283, 35-40.
- SCHREIBER A.B., COURAND P.O., ANDRE C. *et al.* Anti-alprenelol anti-Id antibodies bind to β -adrenergic receptors and modulate catecholamine-sensitive adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1980, 77, 7385-7389.
- SCHREIBER J.R., NIXON K.L., TOSI M.F. *et al.* Antiidiotype-induced, lipopolysaccharide-specific antibody response to *Pseudomonas aeruginosa*. II. Isotype and functional activity of the anti-idiotypic-induced antibodies. *J. Immunol.*, 1991, 146, 188-193.

- SCHUSTER J. Pepsin hydrolysis of IgA delineation of two population of molecules. *Immunochem.*, 1971, 8, 405-411.
- SEGE K. & PATERSON P.A. Use of anti-idiotypic antibodies as cell-surface receptor probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 2443-2447
- SEGE K. & PETE P.A. Antiidiotypic antibodies against anti-Vitamine A transporting protein react with prealbumin. *Nature*, 1978, 271, 167-168.
- SHEARER M.H., LANFORD R.L. & KENNEDY R.C. Monoclonal antiidiotypic antibodies induce humoral immune responses specific for simian virus 40 large tumor antigen in mice. *J. Immunol.*, 1990, 145, 932-939.
- SHER A., COFFMAN R.L., HIENY S. *et al.* Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J. Immunol.*, 1990, 145, 3911-3916.
- SHER A., FIORENTINO D., CASPAR P. *et al.* Production of IL-10 by CD4⁺ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J. Immunol.*, 1991, 147, 2713-2716.
- SHER A., HALL B.F. & VADAS M.A. Acquisition of murine major histocompatibility genes products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.*, 1978, 148, 46-57.
- SHER A., JAMES S.L., CORREA-OLIVEIRA R., *et al.* Schistosomes vaccines : current progress and future prospects. *Parasitology*, 1989, 98, 61-68.
- SHOEMAKER C., GROSS A., GEBREMICHAEL A. *et al.* cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, 89, 1842-1846.
- SHORT R.B. Sex and single schistosome. *J. Parasitol.*, 1983, 69, 4-22.
- SIMPSON A.J.G., CORREA-OLIVEIRA R., SMITHERS S.R. *et al.* The exposed carbohydrates of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their modification during maturation *in vivo*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1983, 8, 191-205.
- SKERRA A. & PLUCKTHUN A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, 1988, 240, 1038-1041.
- SKUBITZ K.M. & SNOOK, R.W. II. Monoclonal antibodies that recognize lacto-N-fucopentaose III (CD15) react with the adhesion-promoting glycoprotein family (LFA-I/HMAC-I/CP 150,95) and CR1 on human neutrophils. *J. Immunol.*, 1987, 139, 1631-1639.
- SKUBITZ K.M., WEISDONF D.J. & PETERSON P.K. Monoclonal antibody AHN-I inhibits phagocytosis by human neutrophils. *Blood* 1985, 65, 333-339.
- SMITHERS S.R. & DOENHOFF H.J. *Schistosomiasis In Immunology of parasitic infections*. Boston Blackwell scientific edition, 1982, 527-607.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. Acquired resistance to experimental infections of *Schistosoma mansoni* in the albinos rat. *Parasitology*, 1965, 55, 695 - 699.
- SMORODINSKY N.L., GHENDIER Y., BAKIMER R. *et al.* Towards an idio type vaccine against mammary tumors. *Eur. J. Immunol.*, 1988, 18, 1713-1718.
- SMYTHIES L.E., COULSON, P.S. & WILSON R.A. Monoclonal antibody to IFN- γ modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J. Immunol.*, 1992b, 149, 3654-3661.
- SONODA E., MATSUMOTO R., HITOSHI E. *et al.* Transforming growth factor β induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J. Exp. Med.*, 1989, 170, 1415-1420.
- SPITSIN S.V., DROBYSNEVSKAYA E.L., BARKHATOVA O.L. *et al.* Induction of the immune response to *Legionella pneumophila* cytolysin by monoclonal and antiidiotypic antibodies. *J. Immunol.*, 1991, 147, 2001-2005.
- SPITZER R.E., STITZEL A.E. & TSOKOS G.C. Autoantibody to the alternative pathway C3/C5 convertase and its antiidiotypic response. *J. Immunol.*, 1992, 148, 137-141.
- SRIVATSAN J., SMITH D.F. & CUMMINGS R.D. The Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni* Synthesizes Glycoproteins Containing the Lewis X Antigen. *J. Biological Chemistry*, 1992, 267, 20196-20203.
- STEIN K.E. & SODERSTROM T. Neonatal administration of idio type or anti-ido type primes for protection against *E. coli* K13 infection in mice. *J. Exp. Med.*, 1984, 160, 1001-1041.
- STRAYER D.S., LEE W.M.F., ROWLEY D.A. *et al.* Anti-receptor antibody II. Induction of long-term unresponsiveness in neonatal mice. *J. Immunol.*, 1975, 114, 728-733

SU S., WARD M.N., APICELLA M.A. *et al.* A nontoxic idiotope vaccine against gram-negative bacterial infection. *J. Immunol.*, 1992, 148, 234-238.

I

TANAKA-HALL T.M., JOSEPH G.T. & STRAND M. *Schistosoma mansoni*: molecular cloning and sequencing of the 200-kDa chemotherapeutic target antigen. *Exp. Parasitol.*, 1995, 80, 242-249.

TAVLADORAKI P., BENVENUTO E., TRINCA S. *et al.* Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature*, 1993, 366, 469-472.

TCHUEM TCHUENTE L.A. Change of mate and mating competition between males of *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni*. *Parasitology*, 1995, 110, 45-52.

TCHUEM TCHUENTE L.A., SOUTHGATE V.R., COMBES C. *et al.* Mating behaviour in schistosomes: are paired worms always faithful. *Parasitol. Today*, 1996, 12, 231-236.

TENDLER M., BRITO C.A., VILAR M.M. *et al.* A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996, 93, 269-273.

THANAVALA Y.M. & ROITT I.M. Monoclonal anti-idiotypic antibodies as surrogates for hepatitis B surface antigen. *Int. Rev. Immunol.*, 1986, 1, 27-39

THANAYALE Y.M., BOND A., TEDDER R. *et al.* Monoclonal internal image anti-idiotypic antibodies of hepatitis B antigen. *Immunology*, 1985, 55, 197-204.

TOWBIN H., SRAEHELIN T., & GORDON J. Electrophoretic transfer from polyacrylamide gels onto nitrocellulose sheets. *Proc. Nat. Acad. USA.*, 1979, 76, 4650 - 4353.

TRAUNECKER A., LANZAVECCHIA A. & KARJALAINEN K. Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells. *EMBO J.*, 1991, 10, 3655-3659.

TRENKNER E. & RIBLET R. Induction of anti-phosphorylcholine antibody formation by anti-idiotypic antibodies. *J. Exp. Med.*, 1975, 142, 1123-1132

TROTTEIN F., GODIN C., PIERCE R.J. *et al.* Inter-species variation of schistosome 28 kDa glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992, 54, 63-72.

TROTTEIN F., NUTTEN S., PAPIN J.P. *et al.* Role of Adhesion Molecules of the Selectin-Carbohydrate Families in Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity to Schistosome Targets. *J. Immunol.*, 1997, 159, 804-811.

TSUCHIYA N., WILLIAMS R.C. & FLETCHER L.M. Rheumatoid factors may bear the internal image of the Fcγ binding protein of herpes simplex virus, Type 1. *J. Immunol.*, 1990, 144, 4742-4748.

U

UNDERDOWN B.J. & DORRINGTON K.J. Studies on the structural and conformational basis for the relative resistance of serum and secretory immunoglobulin A to proteolysis. *J. Immunol.*, 1974, 112, 949-959.

URBAIN J., WUILMART C. & CAZENAVE P.A. Idiotypic regulation in immune network. *Cont. Topics in Mol. Immunol.* 1981, 8, 113-148

UYTDEHAAG F.G.C.M. & OSTERHAUS A.D.M.E. Induction of neutralizing antibody in mice against poliovirus type 11 with monoclonal anti-idiotypic antibody. *J. Immunol.*, 1985, 134, 1225-1229.

V

VAERMAN J.P. & LANGENDRIES A. Hepatobiliary transport of IgA in the golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Immunol. Lett.*, 1997, 55, 19-26.

VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHALF E. *et al.* A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol.*, 1971, 33, 988 - 991.

VAJDY M., KOSCO-VILBOIS M.H., KOPF M. *et al.* Impaired mucosal immune responses in interleukin 4-targeted mice. *J. Exp. Med.*, 1995, 181, 1, 41-53.

VAN CLEAVE W.H., NAEVE C.W. & METZGER D.W. Do antibodies recognize amino acid side chains of protein antigens independently of carbon backbone. *J. Exp. Med.*, 1988, 167, 1841-1848.

VAN DAM G.J., BERGWERFF A.A., THOMAS-OATES J.E. *et al.* The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the

- human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis x as repeating unit. *Eur. J. Biochem.*, 1994, 225, 467-482.
- VAN DAM G.J., BOGITSH B.J., VAN ZEYL R.J. *et al.* *Schistosoma mansoni* : in vitro and in vivo excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. *J. Parasitol.*, 1996, 82, 557-564.
- VAN DAM G.J., CLAAS F.H., YAZDANBAKHSI M. *et al.* *Schistosoma mansoni* excretory circulating cathodic antigen shares Lewis-x epitopes with a human granulocyte surface antigen and evokes host antibodies mediating complement-dependent lysis of granulocytes. *Blood*, 1996, 88, 4246-4251.
- VAN DAM G.J., SEINO J., ROTMANS J.P. *et al.* *Schistosoma mansoni* circulating anodic antigen but not circulating cathodic antigen interacts with complement component C1q. *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23, 2807-2812.
- VAN KUIK J.A., VAN HALBEEK H., KAMERLING J.P. *et al.* Primary structure of the low-molecular-weight carbohydrate chains of helix pomatia alpha-hemocyanin. Xylose as a constituent of N-linked oligosaccharides in an animal glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 13984-13988.
- VAN LIESHOUT L., PANDAY U.G., DE JONGE N. *et al.* Immunodiagnosis of schistosomiasis *mansoni* in a low endemic area in Surinam by determination of the circulating antigens CAA and CCA. *Acta Trop.*, 1995, 59, 19-29.
- VAN SNICK J., CAYPHAS S., VINK A. *et al.* Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986, 83, 9679-9683.
- VAN VLASSELAER P., PUNNONEN J. & DE VRIES J.E. Transforming growth factor- β direct IgA switching in human B cells. *J. Immunol.* 1992, 148, 2062-2067.
- VAZGAS J.A., VESSEY D.A. & SCHUMCKER D.L. Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on intestinal mucosal immunity in young adult and aging rats. *Exp. Gerontol.*, 1998, 5, 499-505.
- VELGE-ROUSSEL F., VERWAERDE C., GRZYCH J.M. *et al.* Protective effects of anti-antiidiotypic IgE antibodies obtained from an IgE monoclonal antibody specific for a 26-kilodalton *Schistosoma mansoni* antigen. *J. Immunol.*, 1989, 142, 2527-2532.
- VELUPILLAI P. & HARN D.A. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220⁺ cells from schistosome-infected mice : A mechanism for regulation of CD4⁺ T-cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1994, 91, 18-22.
- VERWAERDE C., AURIAULT C., DAMONNEVILLE M. *et al.* Role of serine proteases of *Schistosoma mansoni* in the regulation of IgE synthesis. *Scan. J. Immunol.*, 1986, 24, 509-516.
- VERWEIJ J.J., POLDERMAN A.M., VISSER L.C. *et al.* Measurement of antibody response to keyhole limpet haemocyanin was not adequate for early diagnosis of schistosomiasis in a group of Dutch visitors to Mali. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1995, 89, 48-50.
- VICTOR C., BONA C. & PERNIS B. Idiotype-determined circuits in maternally suppressed mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1983, 418, 220-229.
- VICTOR C., BONA C. & PERNIS B. Idiotypes on B lymphocytes: association with immunoglobulins. *J. Immunol.*, 1983, 130 (4), 1819-1825.
- VICTOR-KROBIN C., BARAK Z., BONILLA F.A. *et al.* Network and regulation of the idiotypic repertoire in Szentivanyi A, Maurer PH, Janicki BW, Eds. *Antibodies: structure, synthesis, function and immunologic intervention in disease.* New York: Plenum Publ. Corp., 1987, 91-105.
- VICTOR-KROBIN C., BARAK Z.T., BONILLA F.A. *et al.* A molecular and structural analysis of the VH and VK regions monoclonal antibodies bearing A48 regulatory idiotype. *J. Immunol.*, 1990, 144, 614-624.

W

WAKATSUKI Y. & STROBER W. Effect of downregulation of germline transcripts on immunoglobulin A isotype differentiation. *J. Exp. Med.* 1993, 178, 129-138.

WANG V.S., ZHANG R.J., BONA C. *et al.* Promotion of animal growth with a monoclonal antiidiotype specific to anti-porcine growth hormone antibody. *Mol. Immunol.*, 1994, 31, 651-656.

WARREN K.S. & BERRY E.G. Induction of hepatosplenic disease by single pairs of the Philippine, Formosan, Japanese, and Chinese strains of *Schistosoma japonicum*. *J. Infect. Dis.*, 1972, 126, 482-491.

- WARREN K.S. The immunopathogenesis of schistosomiasis: a multidisciplinary approach. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1972, 66, 417-434.
- WARREN K.S., DOMINGO E.O. & COWAN R.B. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *Am. J. Pathol.*, 1967, 51, 735-756.
- WATERS S.J. & BONA C.A. Characterization of a T-cell clone recognizing idiotopes as tumor-associated antigens. *Cell. Immunol.*, 1988, 111, 87-93.
- WATT G., WHITE N.J., PADRE L. *et al.* Praziquantel pharmacokinetics and side effects in *Schistosoma japonicum*-infected patients with liver disease. *J. Infect. Dis.*, 1988, 157, 530-535.
- WEINER L.M., STEPLEWSKI Z. & KOPROWSKI H. Biologic effects of gamma interferon pretreatment followed by monoclonal antibody 17-1A administration in patients with gastrointestinal carcinoma. *Hybridoma*, 1986, 5, 565-577.
- WEISS J.B. & STRAND M. Characterization of developmentally regulated epitopes of *Schistosoma mansoni* egg glycoprotein antigens. *J. Immunol.*, 1985, 135, 1421-1429.
- WEISS J.B., ARONSTEIN W.S. & STRAND M. *Schistosoma mansoni*: stimulation of artificial granuloma formation *in vivo* by carbohydrate determinants. *Exp. Parasitol.*, 1987, 64, 228-236.
- WEISS J.B., MAGNANI J.L. & STRAND M. Identification of *Schistosoma mansoni* glycolipids that share immunogenic carbohydrate epitopes with glycoproteins. *J. Immunol.*, 1986, 136, 4275-4282.
- WERGE T.M., BALDARI C.T., TELFORD J.L. *et al.* Intracellular single chain Fv antibody inhibits Ras activity in T-cell antigen receptor stimulated Jurkat cells. *FEBS Lett.*, 1994, 351, 393-396.
- WESTERINK M.A., CAMPAGNANI A.A., WIRTH M.A. *et al.* Development and characterization of an anti-idiotypic antibody to the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C. *Infect. Immun.*, 1988, 56, 1120-1127.
- WESTERINK M.A.J., GIARDINA P.C., APICELLA M.A. *et al.* Peptide mimicry of the meningococcal group C capsular polysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 4021-4025.
- WHITTLE N., ADAIR J., LLOYD C. *et al.* Expression in COS-cells of a mouse-human chimeric B72.3 antibody. *Protein Eng.*, 1987, 1, 499-505.
- WIKLER M., DEMEUR C., DEWASME G. *et al.* Immunoregulatory role of maternal idiotypes. Ontogeny of immune networks. *J. Exp. Med.*, 1980, 152 (4), 1024-1035.
- WILSON A., GEORGE A.J.T., KING C.A. *et al.* Recognition of a B cell lymphoma by anti-idiotypic T cells. *J. Immunol.*, 1990, 145, 3937-3943.
- WINKLER D.A. Molecular modeling studies of "flap up" mannosyl cation mimics. *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 4332-4334.
- WOLOWCZUK I., AURIAULT C., GRAS-MASSE H. *et al.* Protective immunity in mice vaccinated with the *Shistosoma mansoni* P-28-1 antigen. *J. Immunol.*, 1989, 142, 1342-1350.
- WOODWARD M.P., YOUNG JR W.W., & BLOODGOOD R.A. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J. Immunol. Methods*, 1985, 74, 143 - 153.
- WU T.T. & KABAT E.A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones protein and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.*, 1970, 132, 211-250
- WYNN T.A., ELTOUM I., CHEEVER A.W. *et al.* Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 1993, 151, 1430-1440.

X

XU C.B., VERWAERDE C., GRAS-MASSE H. *et al.* *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains. *J. Immunol.*, 1993, 150, 940-949.

XU C.B., VERWAERDE C., GRZYCH J.M. *et al.* A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur. J. Immunol.*, 1991, 21, 1801-1807.

XU S., SHI F., SHEN W. *et al.* Vaccination of sheep against *Schistosoma japonicum* with either glutathione S-transferase, keyhole limpet

haemocyanin or the freeze / thaw schistosomula / BCG vaccine. *Vet. Parasitol.*, 1995, 58, 301-312.

XU X., STACK R.J., RAO N. *et al* Schistosoma mansoni : fractionation and characterization of the glycocalyx and glycogen-like material from cercariae. *Exp. Parasitol.*, 1994, 79, 399-409.

XUE C.G., TAYLOR M.G., BICKLE Q.D. *et al*. Diagnosis of *Schistosoma haematobium* infection : evaluation of ELISA using keyhole limpet haemocyanin or soluble egg antigen in comparison with detection of eggs or haematuria. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, 87, 654-658.

Y

YOKOTA T., MILENIC D.E., WHITLOW M. *et al*. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.*, 1992, 52, 3402-3408.

YOSHINO T.P. & BAYNE C.J. Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.*, 1983, 5, 317-328.

YOSHINO T.P. & CHENG T.C. Snail host-like antigens associated with the surface membranes of *Schistosoma mansoni* miracidia. *J. Parasitol.*, 1978, 64, 752-754.

Z

ZAGHOUBANI H., BONILLA F.A., MEEK K. *et al*. Molecular basis for expression of the A48 regulatory idiotope on antibodies encoded by V genes from various families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 2341-2345.

ZAGHOUBANI H., GOLDSTEIN D., SHAH H. *et al*. Induction of antibodies to the envelope protein of the human immunodeficiency virus by immunization with monoclonal anti-idiotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 5645-5649.

ZAGHOUBANI H., KRISTAL M., KUZU H. *et al*. Cells expressing a heavy chain immunoglobulin gene carrying a viral T cell epitope are lysed by specific cytolytic T cells. *J. Immunol.*, 1992, 148, 3604-3609.

ZENKE G., EICHMANN K. & EMMRICH F. Idiotope mapping on the variable region of an antibody clonotype produced by normal (nonmalignant) human B cells. *J. Immunol.*, 1985, 135, 4066-4072.

ZHOU S.R., WHITAKER J.H. & DWYER D. The modulatory effect of anti-idiotypic antibody on hybridoma cells secreting antibody to human myelin basic protein peptide. *J. Neuroimmunol.*, 1990, 29, 113-124.

ZODDA D.M. & PHILLIPS S.M. Monoclonal antibody-mediated protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice. *J. Immunol.*, 1989, 129, 2326-2328.

Z

ZAGHOUANI H., BONILLA F.A., MEEK K. *et al.* Molecular basis for expression of the A48 regulatory idiotope on antibodies encoded by V genes from various families. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 2341-2345.

ZAGHOUANI H., GOLDSTEIN D., SHAH H. *et al.* induction of antibodies to the envelope protein of the human immunodeficiency virus by immunization with monoclonal antiidiotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 5645-5649.

ZAGHOUANI H., KRYSTAL M., KUZU H. *et al.* Cells expression a heavy chain immunoglobulin gene carrying a viral T cell epitope are lysed by specific cytolytic T cells. J. Immunol., 1992, 148, 3604-3609.

ZENKE G., EICHMANN K. & EMMRICH F. Idiotope mapping on the variable region of an antibody clonotype produced by normal (nonmalignant) human B cells. J. Immunol., 1985, 135, 4066-4072.

ZHOU S.R., WHITAKER J.H. & DWYER D. The modulatory effect of anti-idiotypic antibody on hybridoma cells secreting antibody to human myelin basic protein peptide. J. Neuroimmunol., 1990, 29, 113-124.

ZODDA D.M. & PHILLIPS S.M. Monoclonal antibody-mediated protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice. J. Immunol., 1989, 129, 2326-2328.

